

Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela progesterona no leito coronariano de ratos normotensos

Jéssyca Aparecida Soares Giesen

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Vitória, Maio de 2019

JÉSSYCA APARECIDA SOARES GIESEN

**Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela
progesterona no leito coronariano de ratos
normotensos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos

**Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Vitória, Maio de 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA
AO GRAU DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula da Candidata: 2017132600

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela progesterona no leito coronariano de ratos normotensos", apresentada e defendida publicamente pela aluna Jéssyca Aparecida Soares Giesen, no dia 23 de maio de 2019, às 14 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Vitória, 23 de Maio de 2019.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli – Membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Prof. Dr. Hélder Mauad – Membro externo
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas -
SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G455d Giesen, Jéssyca Aparecida Soares, 1992-
Diferenças sexuais no relaxamento induzido pela progesterona no
leito coronariano de ratos normotensos / Jéssyca Aparecida Soares
Giesen. - 2019.
114 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Sistema cardiovascular - Doenças. 2. Artérias coronárias.
3. Hormônios sexuais. 4. Progesterona. 5. Endotélio. I. dos Santos, Roger
Lyrio. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

À minha mãe que sempre foi o meu maior exemplo, meu suporte e nunca deixou de cuidar de mim, principalmente durante a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que foi o meu maior companheiro nesta jornada. Que me guiou até aqui e, por vezes, me deu paciência, sabedoria e, principalmente, forças para superar as dificuldades do caminho.

Agradeço aos meus pais, Rosane D'arc Sores Alvarenga e João Aloísio Giesen, que são parte mais importante da minha vida e fizeram desse sonho, também os seus sonhos, proporcionando-me todo o suporte possível. Agradeço, em especial, à minha mãe que sempre esteve ao meu lado. Mãe, você foi parte fundamental do meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos familiares: irmã (Liliane Aparecida Soares Alvarenga), sobrinhos e sobrinha (Andrew, Ana Kelly, Calebe), tios e tias (em especial, Patrícia Regina Soares Moraes, Marli Soares Rebuli e Beatriz Soares), primos e primas e minha querida avó lêda por entenderem e apoiarem os meus sonhos, principalmente nos momentos em que estive ausente.

Ao meu namorado e companheiro Wender do Nascimento Rouver, que esteve ao meu lado em todos os momentos e se fez suporte sempre que necessário. Wender, obrigada pelo apoio desde o início deste projeto. Por desenhar e idealizar cada detalhe comigo. Sou imensamente grata pelo seu empenho e companheirismo!

Aos meus amigos “mínions”: Alex Santos Coswosk, Caroline Borine Vazzoler, Haissa de Abreu Caitano, Maristela Cicherelo, Nayara Carvalho da Silva, Suiany Vitorino Gervásio e Vinícius Castro de Freitas, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis. Mínions, obrigada pelos conselhos e todo o carinho que tiveram comigo! Vocês são os melhores presentes que a UFES me deu! São pessoas excepcionais! Esta foi apenas mais uma das tantas jornadas que ainda temos juntos. A vocês expresso minha eterna gratidão.

Aos professores Dr. Giuseppe Gava Camiletti e Dr^a. Junia Freguglia pelos ensinamentos, compartilhamento de experiências e conselhos. Vocês foram âncoras de grande parte do meu aprendizado acadêmico e extra-acadêmico

durante a execução deste projeto que começou em 2016, ainda na iniciação científica, e se estendeu até o curso de mestrado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Roger Lyrio dos Santos, por ter me aceito como aluna desde a iniciação científica, por ter me concedido este projeto e por ser o principal motivador para que eu ingressasse no curso de mestrado.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Reatividade Vascular Coronariana (ReativaLab) da UFES: Nathalie Tristão, Angelina Rafaela Debortoli, Tagana Rosa da Cunha, Juan Carlos Arapa Dias, Matheus Zucolotto Homem, Pamella Loureiro, Jeisdens Fernandes de Assis, Rogério Krohling, Emilly Vila Real dos Santos, Juliana Lago do Carno, Lucas Sales, Leticia Tinoco, Débora Tacon, Tiago da Silva Pereira, Hugo Pessoti, Jocimar José Pitol, Brenda Foerst, Ana Dária Bissoli e Lara Caroline Amaro, por todo o apoio. O compartilhamento de conhecimentos, experiências e momentos foram essenciais para a execução deste trabalho e para minha formação tanto profissional como pessoal.

Aos membros do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial, Dr. Eduardo Damasceno Costa e Prof^a. Dr^a. Virginia Soares Lemos pela parceria, disponibilidade e contribuição na coleta de dados.

Aos parceiros do laboratório de Regulação Neurohumoral da Circulação da UFES, em especial, Erick Roberto Gonçalves Cláudio e Fabrício Bragança da Silva por toda contribuição para realização deste projeto.

Aos colegas da pós graduação, em especial, Wedson Correa e Nathalie Pinho por se colocarem a disposição para todos os momentos.

Aos professores do PPGCF – UFES, por serem pessoas inspiradoras, exemplos de profissionais, e por todo conhecimento mediado.

Aos professores Dr. Hélder Mauad e Dr. Jones Bernardes Graceli por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho, pela atenção, disponibilidade e fundamental contribuição.

Aos profissionais técnicos do PPGCF-UFES, em especial, Anderson Almeida, Cíntia Silva Lirio, Rodolpho José da Silva Barros e Cynara Oliveira Possamai que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho.

À UFES e a CAPES pela bolsa e auxílio financeiro concedido durante a realização do curso de mestrado.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho o meu mais sincero muito obrigada!

*On ne voit bien qu'avec le coeur.
L'essentiel est invisible pour les yeux"*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT..... | xiii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| LISTA DE TABELAS..... | xix |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xx |
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E MENOPAUSA..... | 23 |
| 1.2. BREVE HISTÓRICO DA PROGESTERONA NATURAL..... | 27 |
| 1.3. PROGESTERONA: DA SÍNTESE À AÇÃO..... | 28 |
| 1.4. PROGESTERONA E A FUNÇÃO VASCULAR | 31 |
| 2. OBJETIVOS..... | 39 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 39 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 39 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 41 |
| 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 41 |
| 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 41 |
| 3.3.1 Esfregaço vaginal | 41 |
| 3.3.2 Reatividade Vascular | 42 |
| 3.3.3 Dissecção de artérias coronárias..... | 46 |
| 3.3.4 Diamonofluoresceína (DAF-2)..... | 46 |
| 3.3.5 Dihidroetídio (DHE)..... | 47 |
| 3.3.6. Diclorofluoresceína (DCF)..... | 48 |
| 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 50 |
| 4. RESULTADOS..... | 52 |
| 4.1 REATIVIDADE VASCULAR | 52 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.1. Pressão de perfusão coronariana e diferença sexual | 52 |
| 4.1.2 Influência do ciclo estral em resposta à progesterona | 54 |
| 4.1.3 Participação dos mediadores endoteliais em resposta à progesterona | 54 |
| 4.1.4 Participação de espécies reativas de oxigênio em resposta à progesterona..... | 59 |
| 4.1.5 Participação de possíveis receptores envolvidos na resposta da progesterona..... | 61 |
| 4.1.6 Representação dos mediadores e receptores envolvidos na resposta da progesterona | 64 |
| 4.2 NÍVEIS VASCULARES DE NO, O ₂ ^{•-} E H ₂ O ₂ | 66 |
| 5. DISCUSSÃO | 71 |
| 6. CONCLUSÃO | 82 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 84 |
| APÊNDICES | 103 |

RESUMO

A progesterona parece exercer um papel na fisiologia cardiovascular uma vez que seus receptores são expressos em células endoteliais de ambos os sexos de mamíferos, entretanto pouco se sabe sobre sua ação na circulação coronariana. Desta forma, nosso objetivo foi investigar o efeito da administração aguda de progesterona e envolvimento de seus possíveis mediadores endoteliais sobre o leito vascular coronariano de ambos os sexos de ratos normotensos. Utilizamos ratos de ambos os sexos para os protocolos previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA – UFES, número 64/2017). Os protocolos experimentais foram conduzidos pelo método de Langendorff modificado. A reatividade vascular do leito coronariano foi avaliada por curva dose resposta de progesterona (1-50 μM , *in bolus*) em corações isolados de fêmeas e machos. A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi determinada e o efeito da progesterona foi avaliado antes e após perfusão com N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), indometacina (2.8 μM), clotrimazol (0,75 μM), catalase (1000 u/mL), Tiron (1 mM) e apocinina (30 μM), mifepristona (1 μM) e G36 (1 μM), por 20 minutos. As análises dos níveis de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram realizadas por DAF-2 (10 μM), DHE (5 μM) e DCF-DA (10 μM), respectivamente, com estímulo de progesterona (50 μM) na presença de L-NAME (300 μM), Tiron (10 μM) e catalase (1000 u/mL). As fêmeas apresentaram uma PPC maior que os machos. Entretanto, a progesterona promoveu relaxamento de forma similar em ambos os sexos. Após inibição da síntese de NO tanto fêmeas quanto machos tiveram a resposta vasodilatadora aumentada, quando comparada a resposta na ausência de inibidor. Essa resposta foi confirmada com o aumento da produção de NO em ambos os sexos sob estímulo da progesterona. Após inibição da síntese de prostanoídes, apenas os machos tiveram a resposta reduzida. Quando inibimos a síntese dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), candidatos a fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), a resposta a progesterona foi similar em ambos os sexos. Embora os machos tenham apresentado produção aumentada de H_2O_2 , apenas as fêmeas tiveram a vasodilatação a progesterona reduzida quando inibimos esse outro possível candidato a EDHF. Além disso, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ parece estar envolvido nesta resposta nas fêmeas, tendo em vista que a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi aumentada após estimulação com progesterona e a vasodilatação a

progesterona foi diminuída tanto na presença de Tiron quanto de apocinina. Após inibição de receptores nucleares de progesterona (PR), com mifepristona, apenas as fêmeas tiveram a resposta atenuada. Em contrapartida, após inibição do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), com G36, o relaxamento foi completamente abolido em ambos os sexos. Estes resultados sugerem papel protetor da progesterona, de modo a promover relaxamento no leito coronariano de ratos de ambos os sexos por meio de mediadores endoteliais sexo específico.

Palavras chave: *Progesterona, artérias coronárias, reatividade vascular, endotélio, vasodilatação.*

ABSTRACT

Progesterone seems to play a role in cardiovascular physiology, since its receptors are expressed on endothelial cells from both sexes of mammals. However, little is known about its action on coronary circulation. Thus, the purpose of this study was to investigate the acute effect of progesterone administration and the involvement of possible endothelial mediators in this action on the coronary vascular bed from normotensive rats of both sexes. We used Wistar rats of both sexes on the protocols previously approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Espirito Santo under protocol #64/2017. The experimental protocols were conducted by the modified Langendorff method. The vascular reactivity of the coronary vascular bed was evaluated by dose response curve of progesterone (1-50 μM , *in bolus*) in isolated hearts from females and males rats. Coronary perfusion pressure (CPP) was determined and the progesterone effect was assessed before and after perfusion with N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), indomethacin (2,8 μM), clotrimazole (0,75 μM), Catalase (1000 u/mL), Tiron (1 mM), apocynin (30 μM), mifepristone (1 μM) and G36 (1 μM). The analysis of nitric oxide (NO), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels and were performed by DAF-2 (10 μM), DHE (5 μM) and DCF-DA (10 μM), respectively, with progesterone (50 μM) stimulation in the presence of L-NAME (300 μM), Tiron (10 μM) and catalase (1000 u/mL). The sexual difference in CPP was confirmed so that females had a higher CPP when compared with males. However, progesterone showed similar vasodilatation in both sexes. After inhibition of NO synthesis, both females and males had an increased vasodilatory response when compared to the curve performed in the absence of inhibitor. This response was confirmed with increased NO production in both sexes following stimulation with progesterone. After inhibition of prostanoids synthesis, only males had a reduced response. When we inhibited the synthesis of epoxyeicosatrienoic acids (EETs), EDHF candidate, the progesterone response was similar in both sexes. Although males showed increased production of H_2O_2 , only females had reduced progesterone vasodilation when we inhibited this possible candidate for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). In addition, $\text{O}_2^{\bullet-}$ appears to be involved in this response in females, since $\text{O}_2^{\bullet-}$ production was increased following stimulation with progesterone and vasodilation to progesterone was decreased both in the presence of Tiron and apocynin. After inhibition of

progesterone nuclear receptors (PR), with mifepristone, the vasodilation was attenuated only in females. In contrast, after inhibition of the estrogen receptor coupled to protein G (GPER), with G36, the relaxation was abolished in both sexes. These results suggest a protective role of progesterone, which promotes relaxation in the rats coronary vascular bed of both sexes by means of sex specific endothelial mediators.

Keywords: *Progesterone, coronary arteries, vascular reactivity, endothelium, vasodilation*

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Efeitos da progesterona e do acetato de medroxiprogesterona no sistema cardiovascular | 26 |
| Figura 2: Esteroidogênese: uma revisão..... | 29 |
| Figura 3: Representação esquemática das ações genômicas e não genômicas dos hormônios esteróides..... | 32 |
| Figura 4: Representação do fluido vaginal seco não marcado obtido em diferentes dias do ciclo estral de ratos. A, B: Proestro; células tendem a aparecer em aglomerados e têm uma aparência granular. C: Proestro; as células podem alternativamente estar presentes como cadeias. D: Estro; células queratinizadas clássicas, semelhantes a agulhas. E: Estro; células podem aparecer alternativamente arredondadas, com bordas irregulares. F: Metaestro ou diestro I; uma combinação de "células de pavimento" redondas, algumas células semelhantes a agulhas e alguns leucócitos menores podem estar presentes durante um período de transição durante a primeira porção do primeiro dia de diestro. G: Diestro ou diestro II; os leucócitos podem aparecer em combinação com várias células arredondadas maiores. H: Diestro ou diestro II; esfregaço leucocitário clássico com algumas células epiteliais redondas maiores..... | 42 |
| Figura 5: Esquema representativo do protocolo experimental de reatividade vascular | 44 |
| Figura 6: Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal dos grupos fêmea (n = 39) e macho (n = 29). Valores expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de <i>Student's t test</i> não pareado. *p < 0,05 quando comparado ao grupo Fêmea..... | 52 |
| Figura 7: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) entre os grupos fêmea (n = 10) e macho (n = 9). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de <i>two-way ANOVA</i> seguida pelo teste <i>post hoc</i> de Bonferroni. A area abaixo da curva (AUC) foi analisada por <i>Student's t test</i> não pareado..... | 53 |

Figura 8: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) entre as fases do ciclo estral: proestro (n = 6), estro (n = 6), metaestro (n = 3) e diestro (n = 5). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.....54

Figura 9: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) antes e após inibição com L-NAME (A – Fêmea, n = 8; B - Macho, n = 9). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....55

Figura 10: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) antes e após inibição com indometacina (A – Fêmea, n = 8; B - Macho, n = 9). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.....56

Figura 11: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina (A – Fêmea, n = 8; B - Macho n = 8). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....57

Figura 12: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina + Clotrimazol (C – Fêmea, n = 8; D - Macho, n = 8). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado.....58

Figura 13: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina + Catalase (C – Fêmea, n = 8; D - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.....59

Figura 14: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após inibição com Tiron, (A - Fêmea, n = 5; B - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.....60

Figura 15: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após inibição com apocinina (C - Fêmea, n = 8.; D - Macho, n = 7). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....61

Figura 16: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após inibição com mifepristona (A - Fêmea, n = 5 ; B - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.....62

Figura 17: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após inibição com G36 (A - Fêmea, n = 5; B - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle.....63

Figura 18: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após 20 minutos de perfusão apenas com solução nutritiva (A – Fêmea, n = 8; B - Macho, n = 7). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* pareado.....64

Figura 19: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DAF-2 em artérias coronárias de (A) fêmeas (n = 4) e (B) machos (n = 4) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0,05. # p < 0,05 comparado as mesmas condições experimentais na ausência de L-NAME. ^a p < 0,05

comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....67

Figura 20: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DHE em artérias coronárias de (A) fêmeas (n = 4) e (B) machos (n = 4) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0,05. # p < 0,05 comparado as mesmas condições experimentais na ausência de Tiron. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....68

Figura 21: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DCF em artérias coronárias de (A) fêmeas (n = 4) e (B) machos (n = 4) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0,05. # p < 0,05 comparado as mesmas condições experimentais na ausência de catalase. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.....69

Figura 22: Possíveis fatores envolvidos no relaxamento induzido pela progesterona no leito coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos. → Estimulação unidirecional. ↔ Estimulação bidirecional. ⊣ Inibição ou bloqueio.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação percentual do aumento da PPC após utilização de diferentes inibidores.....53

Tabela 2: Classificação representativa dos mediadores e receptores envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona no leito coronariano.....65

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD: 3 β hidroxiesteroide

AA: Ácido araquidônico

AC: Adenilato ciclase

Acetil-CoA: Acetilcoenzima A

ACh: Acetilcolina

cAMP: 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico

ANG II: Angiotensina II

ANOVA: Análise de variância

ATP: Adenosina trifosfato

BH₄: (6*R*)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterin

BK_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio de larga condutância

Ca²⁺ (Ca⁺⁺): íon cálcio

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CL: Corpo lúteo

COX 1-2: Ciclooxygenase tipo 1 e tipo 2

cPLA2 α : Fosfolipase A2

Cu: Cobre

CYP: Citocromo P450

DAC: Doença arterial coronariana

DAF-2: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DCF: Diacetato de diclorofluoresceína

DCVs: Doenças cardiovasculares

DHE: Dihidroetídeo

DHETs: Ácidos dihidroepoxieicosatrienoicos

DHT: Diidrotestosterona

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

EET: Ácido Epoxieicosatrienoico

eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EPM: Erro padrão da média

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FMN: flavina mononucleotídeo

cGMP: 3' 5' – guanosine monofosfato cíclico

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GPÉR: Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

GPR30: Receptor acoplado a proteína G 30

GTP: Guanosina trifosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

HERS I e II: *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*

IK_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

K⁺: íon potássio

K_{ATP}: Canais para potássio sensíveis à ATP

K_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio

K_{IR}: Canais para potássio retificadores de influxo

K_v: Canais para potássio dependentes de voltagem

KEEPS: *Kronos Early Estrogen Prevention Study*

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

LOX: Lipoxigenase

MAPK: Proteína-cinases ativadas por mitógenos

Mn: Manganês

MPA: Acetato de medroxiprogesterona

mPR (α, β, γ, δ, ε): Receptores de membrana de progesterona

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

Na⁺/K⁺-ATPase: Na⁺/K⁺-Adenosinatrifosfatase

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOX: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase

O₂: Oxigênio molecular

O₂^{•-}: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PG: Prostaglandinas

PGI₂: Prostaciclina

PGI-S: Prostaciclina sintase

PKA: Proteína cinase dependente de AMP

PKG: Proteína cinase dependente de GMP

PPC: Pressão de perfusão coronariana

PR: Receptor nuclear de progesterona

SK_{Ca}: Canais para potássio dependentes de cálcio de baixa condutância

SOD: Superóxido dismutase

TRH: Terapia de reposição hormonal combinada com estrogênio e progestinas

TRP: Canais receptores de potenciais transitórios

TRPV4: TRP membro 4 da subfamília vanilinoide

TX-S: Tromboxano sintase

WHI: *Women's Health Initiative*



INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E MENOPAUSA

Os estudos epidemiológicos têm apontado as doenças cardiovasculares (DCVs), que incluem doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular encefálico, como as principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2011), inclusive no Brasil (MANSUR; FAVARATO, 2012), sendo responsável por mais mortes que a soma de todos os tipos de câncer (WHO, 2011).

Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2016, representando 31 % de todas as mortes globais. Destas, 85 % são causadas por ataques cardíacos e derrames. Das 17 milhões de mortes prematuras (com menos de 70 anos) devido a doenças não transmissíveis em 2015, 82 % estão em países de baixa e média renda e 37 % são causadas por DCVs (WHO, 2017). A cada 1 em 3 pessoas é acometida por DCVs em países desenvolvidos e mais de 50 % dessas pessoas estão abaixo de 60 anos (BENJAMIN *et al.*, 2018).

É bem estabelecido que os homens são mais acometidos por DCVs quando comparados a mulheres na pré-menopausa (BENJAMIN *et al.*, 2018), ao passo que as mulheres na pós-menopausa têm um risco similar ou maior em comparação aos homens (MOSCA *et al.*, 2007; BENJAMIN *et al.*, 2018). Nesse contexto, com o decorrente aumento de DCVs em mulheres na pós-menopausa, é bem estabelecido um papel protetor dos hormônios sexuais femininos sobre o sistema cardiovascular (ORSHAL; KHALIL, 2004). Além disso, a disfunção endotelial aparenta estar intimamente ligada aos fatores de risco comuns para o desenvolvimento de DCVs (WIDLANSKY *et al.*, 2003; HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005) e as diferenças sexuais parecem ser elemento chave na modulação da função endotelial, podendo levar a um aumento do risco de desenvolvimento de DCVs (MCCULLOCH; RANDALL, 1998; ROSANO; SPOLETINI; VITALE, 2017).

Embora o efeito cardioprotetor observado no sexo feminino durante a pré-menopausa tem sido atribuído, em especial, ao estrogênio (MACLENNAN, 2009), na pós-

menopausa, também ocorre diminuição da produção de progesterona, uma vez que a principal fonte de hormônios femininos, são os oócitos que são depletados na menopausa (DALAL; AGARWAL, 2015).

Por volta dos 40 anos de idade, inicia-se o climatério na vida da mulher, que compreende a transição gradual da fase reprodutiva para a fase não reprodutiva (BRASIL, 2008; ALVES *et al.*, 2015). Neste período ocorre a menopausa, que é a cessação permanente da menstruação, resultando na perda do desenvolvimento dos folículos ovarianos (SPINELLI, 2004). Retrospectivamente, é definida como o tempo do período menstrual final, seguido por 12 meses de amenorréia (SOULES *et al.*, 2001). Antes da menopausa propriamente dita, ocorre a transição menopáusica, ou 'perimenopausa'. Este é um período de tempo definido do início dos ciclos menstruais irregulares até ao último período menstrual que é marcado por flutuações nos hormônios reprodutivos (BURGER *et al.*, 2008; GIBBS; LEE; KULKARNI, 2013).

Depois da última menstruação inicia-se a pós-menopausa (SOULES *et al.*, 2001). Neste período, muitos sintomas são relatados a curto e longo prazo, sendo eles: fogachos, irritabilidade, variações de humor, insônia, menor lubrificação vaginal, confusão mental, sintomas osteoporóticos, depressão, dor de cabeça, sintomas vasomotores, insônia, entre outros (DALAL; AGARWAL, 2015), o que diminui a qualidade de vida da mulher. Assim, para aliviar os sintomas da pós-menopausa e prevenir DVCs e osteoporose, os hormônios sexuais femininos tem sido amplamente utilizados como opção terapêutica (BLUMING; TAVRIS, 2009).

Em estudos observacionais, a mortalidade por casos de doença coronariana, na pós-menopausa, mostrou-se diminuída em 20-40 % com terapia de reposição com estrogênio (ENDERSON; PAGANINI-HILL; ROSS, 1991; GRADY *et al.*, 1992). Esses achados foram um importante gatilho para mulheres usarem terapia de reposição estrogênica após a menopausa (LOBO, 2017).

O efeito protetor do estrogênio no sistema cardiovascular é atribuído principalmente à ações diretas sobre os vasos sanguíneos (MENDELSON; KARAS, 2005), estimulando a liberação de fatores derivados do endotélio (SANTOS *et al.*, 2004, 2014). Esse hormônio tem efeito antiproliferativo (ODENLUND; EKBLAD; NILSSON,

2008) e um importante papel na regulação dos canais iônicos nas células do músculo liso vascular (HAN *et al.*, 2007).

A utilização de terapia de reposição estrogênica em mulheres na pós-menopausa foi associada a uma redução na incidência de DAC e a uma diminuição na taxa de mortes por DCVs (STAMPFER *et al.*, 1991). Entretanto, desde 1975, pesquisas mostram que o tratamento com estrogênio aumenta a incidência de câncer de útero (WEISS, 1975), mas este risco aumentado é eliminado quando se adiciona progestina (GAMBRELL, 1987). As progestinas foram então associadas ao estrogênio em ensaios clínicos, como *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) e HERSII, *Women's Health Initiative* (WHI), com o intuito de reduzir ou eliminar os riscos de seu uso isolado em mulheres com útero (WOODRUFF; PICKAR, 1994), mas falharam em mostrar um papel benéfico dessa terapia, aumentando os efeitos cardiovasculares adversos, como o risco de desenvolver DVCs aumentado e oposição aos efeitos cardioprotetores do estrogênio (HULLEY *et al.*, 1998, 2002; GRIMES; LOBO, 2002; ROSSOUW *et al.*, 2002; DUBEY *et al.*, 2004).

Vários fatores foram apontados como possíveis causas para esses efeitos indesejados da terapia de reposição hormonal combinada com estrogênio e progestinas (TRH), incluindo a idade avançada dos indivíduos (62,5-66,7 anos) e o longo intervalo após a menopausa para o início da terapia (12 ou mais anos), quando pode ter havido declínio na resposta hormonal e da expressão dos receptores de esteroides (ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008). Os tipos de indivíduos selecionados para esses estudos também parecem ser determinantes, uma vez que mulheres já na pós-menopausa, com DAC estabelecida, foram recrutadas para o estudo HERS (HULLEY *et al.*, 1998; ROSSOUW *et al.*, 2002; ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008).

Além desses, outro possível fator relacionado aos efeitos indesejados da TRH pode ser o tipo de progestina usada nesses estudos (ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008). O acetato de medroxiprogesterona (MPA), por exemplo, mostrou ter efeitos divergentes daqueles observados com a progesterona (Figura 1). Diferente da progesterona, o MPA, está associado ao aumento do risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral dentre outros efeitos adversos (HULLEY *et al.*, 1998; GRADY *et al.*, 2002; ROSSOUW *et al.*, 2002; MANSON *et al.*, 2003; BRANDIN *et al.*, 2010).

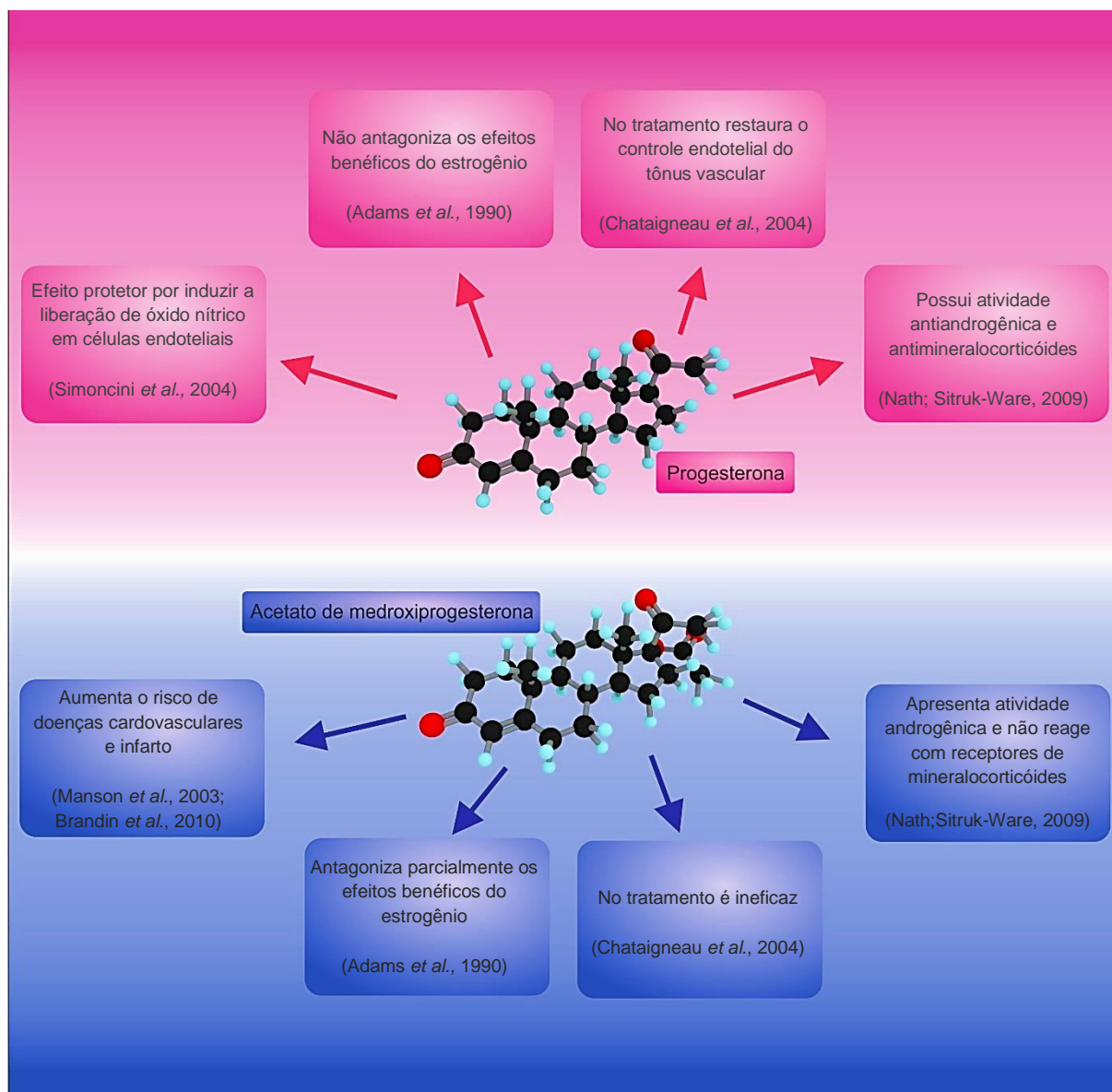


Figura 1: Efeitos da progesterona e do acetato de medroxiprogesterona no sistema cardiovascular.

Desta forma, potenciais efeitos benéficos cardiovasculares do tratamento com progesterona em mulheres pós-menopáusicas foram subestimados e amplamente ignorados, provavelmente devido aos efeitos divergentes da MPA e de outras progestinas sintéticas observadas nos ensaios de TRH, e também devido à escassez de informações sobre os efeitos da progesterona nas funções cardiovasculares (SIMONCINI *et al.*, 2007; BOSCHITSCH; MUECK; SEEGER, 2009; MAYERHOFER; MAGOMETSCHNIGG, 2010). Ao contrário dos efeitos com progestinas sintéticas, em 2013, o *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS), utilizando a progesterona micronizada que possui fórmula estrutural semelhante a progesterona natural, demonstrou efeito benéfico da TRH no sistema cardiovascular. Além disso, este

estudo não detectou aumento significativo do risco de câncer de mama após TRH com estrogênio equino conjugado associado a progesterona micronizada (WHARTON *et al.*, 2013). Desta forma, sugere-se que a progesterona natural tenha efeito cardioprotetor, além de minimizar os riscos induzidos pelo tratamento com estrogênio.

1.2. BREVE HISTÓRICO DA PROGESTERONA NATURAL

A história da progesterona foi iniciada em 1672 com a publicação de Regner de Graaf: “*De mulierum organis generation inservientibus*” em que, pela primeira vez, o sistema reprodutor feminino, incluindo o corpo lúteo (CL), foi descrito em formato de livro (CORNER, 1974). Contudo, foi só em 1898, que o CL foi sugerido como um órgão que secretava uma substância capaz de proteger o embrião e facilitar sua implantação no útero (CORNER, 1974). Essa sugestão foi confirmada com estudos em coelhos, uma vez que o hormônio no CL sustentou a gravidez e foi essencial para a sobrevivência do embrião pré-implantado (ALLEN, 1930)

Em 1933 o “hormônio do corpo lúteo” foi, finalmente, isolado e descrito por Willard Allen (ALLEN, 1932). E, um ano depois, em 1934, foi realizada a conversão de pregnanediol em uma forma quimicamente pura do hormônio do corpo lúteo, que recebeu o nome de progesterona (ALLEN, 1974). Em 1939, a síntese da progesterona pelo colesterol foi realizada de maneira direta por Adolf Butenandt, que foi premiado no mesmo ano, juntamente com Leopold Ruzicka, com o Prêmio Nobel de Química por seu trabalho com hormônios sexuais (NEWTON, 2007).

Embora sintetizada de forma direta, a produção de progesterona ainda demandava altos valores financeiros, mas em meados da década de 1940, deu-se início a síntese de progesterona com menor custo. Isso foi possível a partir da síntese da progesterona por meio de um composto chamado diosgenina, extraído da planta japonesa *Dioscorea tokoro* e, mais tarde, da *Dioscorea mexicana*. Inicialmente, altas concentrações de extrato foram necessárias para atingir um efeito biológico suficiente, entretanto, o desenvolvimento de formulações galênicas permitiu que pequenas quantidades fossem capazes de exercer efeito biológico. A partir disso, a progesterona passou a ser utilizada em terapias hormonais (STEFANICK, 2005).

1.3. PROGESTERONA: DA SÍNTESE À AÇÃO

A progesterona é um hormônio esteróide e um intermediário de esteróides sexuais produzidos por todos os tecidos esteroideogênicos (SATO; MIYAGAWA; IGUCHI, 2016). Os hormônios esteróides são caracterizados por uma estrutura básica comum de ciclopentanoperidrofenantreno, um complexo policíclico de 17 átomos de carbono formando um sistema de quatro anéis (STRAUSS, 2009). O colesterol, precursor comum de todos os hormônios esteróides, é sintetizado de produtos intermediários da interconversão de duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) (ANDERSEN; DIETSCHY, 1978). Uma vez formado, o colesterol sérico é presente no plasma como colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (BROWN; GOLDSTEIN, 1976) que interage com receptores de membrana, internalizado em vesículas e depois fundido com lisossomos. As hidrolases lisossômicas permitem a liberação intracelular do colesterol de forma livre, que é transportado para a mitocôndria para ser, posteriormente, convertido em pregnenolona (TARABORRELLI, 2015).

A pregnenolona liberada das mitocôndrias é convertida à progesterona pela enzima 3β hidroxisteroide desidrogenase (3β -HSD), localizada no retículo endoplasmático liso, nas células da granulosa e células luteínicas do ovário, células de Leydig dos testículos, zona fasciculada e glomerulosa da glândula supra-renal e na placenta (SATO; MIYAGAWA; IGUCHI, 2016). Enquanto, a progesterona produzida a partir das gônadas é transportada principalmente no sangue para exercer sua função biológica, a progesterona de origem adrenal é amplamente convertida em glicocorticóides e andrógenos. A progesterona circula na corrente sanguínea ligada à globulina de ligação ao cortisol (cerca de 10 %) e à albumina sérica. Sua meia-vida é relativamente curta no corpo, apenas cinco minutos. Os metabólitos produzidos principalmente no fígado são reduzidos e excretados na urina (TARABORRELLI, 2015). Os principais metabólitos séricos da progesterona são precursores para esteróides intermediários na biossíntese de androgênios e estrogênios (figura 2). Assim, a progesterona é de fundamental importância para a manutenção dos hormônios esteróides independentemente de suas ações específicas (SHACKLETON; MALUNOWICZ, 2003).

tecidos reprodutivos (CONDON *et al.*, 2006). No entanto, uma terceira isoforma de PR, PR-C, é abundantemente encontrada no tecido miometrial (CONDON *et al.*, 2006). A interação da progesterona aos PR, promovem a ativação de cerca de 300 co-reguladores distintos que atuam no RNA ribossômico (PARKER; CHRISTIAN; WHITE, 2006) e resultam na produção de proteínas correspondentes (LONARD; LANZ; O'MALLEY, 2007). A ativação da transcrição ribossômica leva minutos ou horas (GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2008).

Além de se ligar aos PRs, uma nova classe de receptores de membrana de progesterona (mPR) tem sido indicada como responsável por iniciar ações extranucleares da progesteron. Os mPR são expressos em 5 subtipos: mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ and mPR ϵ presentes em humanos, sendo que o mPR α , mPR β e mPR γ já foram descritos em células endoteliais de veia umbilical humana (TANG *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008).

No sexo feminino, a progesterona afeta a motilidade tubária interagindo em receptores específicos e atua na maturação endometrial e na vascularização uterina na fase pré-implantação. Juntamente com a gonadotrofina coriônica humana e o cortisol tecidual, ela inibe a reação tecidual mediada por linfócitos T entre os compartimentos materno e fetal (SCHNEIDER; DAVIES; HONOUR, 1993). No sexo masculino, o PR é expresso na próstata (BONKHOF *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2014), mas pouco se conhece sobre o seu papel ou função no crescimento normal ou anormal da próstata (YU *et al.*, 2014). A progesterona apresenta um importante papel no processo de esteroidogênese uma vez que regula enzimas responsáveis pela conversão de testosterona em diidrotestosterona (DHT) por meio de PR (CHEN, R.; YU; DONG, 2017). Embora a progesterona exerça suas ações características no sistema reprodutor, ela também desempenha um papel importante em vários tecidos que não pertencem a esse sistema, como sistema nervoso central (ROSSETTI *et al.*, 2016), sistema ósseo (XIU *et al.*, 2016) e sistema cardiovascular (PANG; DONG; THOMAS, 2015). Entretanto, as informações sobre os outros sistemas, principalmente sobre o sistema cardiovascular ainda não foram totalmente elucidadas.

1.4. PROGESTERONA E A FUNÇÃO VASCULAR

O sistema vascular é indispensável para a saúde dos tecidos e órgãos biológicos (NORTH; SINCLAIR, 2012). De modo geral os vasos são formados por três camadas: túnica adventícia, média e íntima (KUMAR, 2014). A camada adventícia é composta principalmente de feixes de colágeno, terminações nervosas e alguns fibroblastos; a camada média é composta de uma lâmina elástica interna apostada por uma ou duas camadas de músculo liso e lâmina elástica externa; e a camada íntima, mais interna, é formada por células endoteliais localizadas em uma membrana basal, formando o endotélio vascular. (MARTINEZ-LEMUS, 2012; FORTIER; GULLAPALLI; MIRSHAMS, 2014). O endotélio é um importante órgão endócrino modulador do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias (SUN; HUANG; KALEY, 2004). Sua integridade é essencial para a manutenção do tônus vascular, de modo que, o prejuízo nessa integridade é causa comum entre as DCVs (TENNANT; MCGEACHIE, 1990).

Já se sabe que os hormônios sexuais podem interagir com o endotélio por meio de receptores nucleares e extranucleares e/ou segundos mensageiros e, assim, estimular fatores vasoativos (MENDELSON; KARAS, 2005), como demonstrado na figura 3. A literatura já demonstrou a presença de receptores de progesterona em células endoteliais (VÁZQUEZ *et al.*, 1999; ORSHAL; KHALIL, 2004) em homens e mulheres (INGEGNO *et al.*, 1988), o que sugere que esse hormônio pode apresentar um importante papel fisiológico na manutenção dos processos vasculares (THOMPSON; KHALIL, 2003). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da progesterona sobre leitos vasculares (SELLES *et al.*, 2001). O que se sabe é que a progesterona, por meio de ações não clássicas, ações que ocorrem sem interação desse hormônio com elementos responsivos presentes no núcleo celular, interage com os vasos, estimulando a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (CUTINI; SELLÉS; MASSHEIMER, 2009; PANG; DONG; THOMAS, 2015).

O endotélio, em resposta a determinados estímulos, é capaz de liberar fatores vasodilatadores, tais como óxido nítrico (NO), protaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), ou fatores vasoconstritores, tais como tromboxano A₂ (TXA₂) e endotelina-1 (ET-1) que participam da modulação do tônus vascular (ORSHAL; KHALIL, 2004; SANDOO *et al.*, 2010).

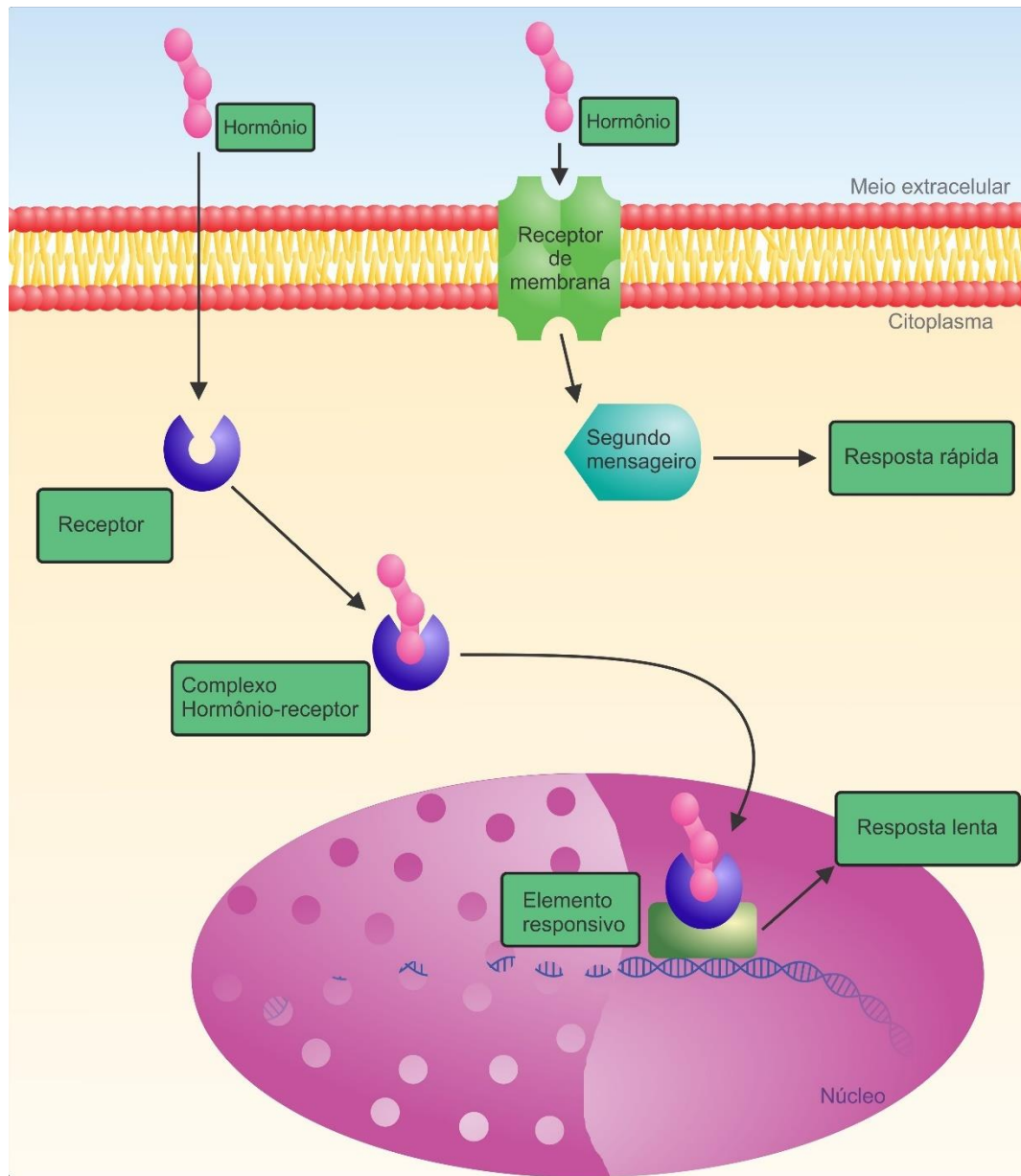


Figura 3: Representação esquemática das ações genômicas e não genômicas dos hormônios esteroides.

O NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima possui 3 isoformas, sendo elas constitutivas: neural (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3); e induzível (iNOS, NOS2) (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2012; FORSTERMANN; SESSA, 2012). Todas as 3 isoformas da NOS são expressas no sistema cardiovascular, mas a eNOS é a isoforma dominante nos vasos (FÖRSTERMANN; LI, 2011). No geral, a NOS utiliza a L-arginina como substrato, oxigênio molecular (O_2) e fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido (NADPH) como co-substratos. Flavina adenina dinucleotideo (FAD), flavina

mononucleotídeo (FMN) e (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH₄) são cofatores de todas as isoformas. A NOS funcional transfere elétrons do NADPH, via FAD e FMN no domínio da redutase carboxiterminal, para o domínio da oxigenase amino-terminal. O domínio oxigenase também se liga ao cofator essencial BH₄, O₂ e ao substrato L-arginina (CRANE *et al.*, 1998; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Para sintetizar o NO, a enzima NOS passa por duas etapas. Num primeiro passo, a NOS hidroxila a L-arginina em N^ω-hidroxil-L-arginina (que permanece largamente ligada à enzima). Em um segundo passo, a NOS oxida N^ω-hidroxil-L-arginina em L-citrulina e NO (STUEHR; POU; ROSEN, 2001).

O NO possui meia vida que varia de aproximadamente 3 a 60 segundos, mas pode ser maior devido ao ambiente, concentração de O₂ e ânion superóxido (O₂^{•-}) (KIECHLE; MALINSKI, 1993). Uma vez sintetizado, o NO se difunde para o músculo liso vascular, onde estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GC), responsável pela conversão de guanosina trifosfato (GTP) em 3', 5'-guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983; FÖRSTERMANN, *et al.*, 1986; IGNARRO *et al.*, 1986). O aumento do cGMP intracelular, ativa a proteína cinase dependente de GMP (PKG) (HANAFY; KRUMENACKER; MURAD, 2001). Uma das funções da PKG é ativar a enzima fosfatase de cadeia leve da miosina, no músculo liso vascular. Essa enzima desfosforila a miosina no músculo liso tendo como resultado final o relaxamento vascular (DUDZINSKI *et al.*, 2006). Além disso, o aumento das concentrações de GMPc e ativação da PKG também diminuem o influxo de íons cálcio, bem como sua liberação dos estoques intracelulares, além de abrir canais para potássio, promovendo hiperpolarização e relaxamento da musculatura lisa vascular (ARNOLD *et al.*, 1977). O NO, ainda por meio de cGMP, pode estimular a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase, o que contribui para hiperpolarização das células do músculo liso vascular (GUPTA *et al.*, 1994; MCKEE; SCAVONE; NATHANSON, 1994; ELIAS *et al.*, 1999).

Embora, o NO seja capaz de modular a atividade de canais para potássio por via dependente de cGMP, ele também é capaz de agir diretamente sobre canais para potássio dependentes de cálcio de larga condutância (BK_{Ca}), o que conseqüentemente causa hiperpolarização da membrana e propicia relaxamento (BOLOTINA *et al.*, 1994; MURRAY *et al.*, 1995; JURY; BOEV; DANIEL, 1996).

O endotélio também promove a produção de prostanoídes (por exemplo, prostaglandinas, PGs, e TXA_2), derivados do ácido todo-cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico, ácido araquidônico (AA). O AA pode ser submetido a ações enzimáticas. Em primeiro lugar, a fosfolipase A2 (PLA_2) degrada fosfolipídios dos estoques celulares e, em seguida, o AA livre é exposto às enzimas disponíveis em vários tipos de células e em vários compartimentos (CHLOPICKI; GRYGLEWSKI, 2004). Nas células endoteliais o AA é metabolizado pela ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), e citocromo P450 (CYP) (ROSOLOWSKY; CAMPBELL, 1993, 1996).

As prostaglandinas sintase mais conhecidas como COX 1 e 2 (COX-1, constitutiva e COX-2, induzível) geram endoperóxidos de prostaglandina (por exemplo: PGH_2). PGH_2 é o substrato para várias sintases, incluindo a tromboxano sintase (TX-S) e prostaciclina sintase (PGI-S). Em plaquetas sanguíneas, a COX-1 é a principal enzima fornecedora de substrato para ação da tromboxano sintase (TXA-S) para formar TXA_2 . No endotélio vascular, a COX-2 forma suprimento para PGI-S sintetizar prostaciclina (PGI_2) (CHLOPICKI; GRYGLEWSKI, 2004).

Uma vez sintetizada, a PGI_2 , que medeia ações vasodilatadoras, rapidamente é convertida a 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$. Sua meia vida é curta (aproximadamente 3 minutos) (MOORE, 1982). A PGI_2 por meio da ativação de adenilato ciclase (AC), que converte adenosina trifosfato (ATP) em 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP), promove aumento dos níveis de cAMP nas células do músculo liso vascular (MITCHELL *et al.*, 2008). Assim, a proteína cinase dependente de AMP (PKA), dependente de cAMP, é ativada e estimula a abertura de diferentes canais para potássio, dependendo da espécie, que culmina em hiperpolarização e consequente relaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Assim, canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), BK_{Ca} , canais para potássio reficadores de influxo (K_{IR}) e/ou canais para potássio dependentes de voltagem (K_{V}) podem estar associados ao relaxamento induzido pela PGI_2 (BOUCHARD; DUMONT; LAMONTAGNE, 1994; TANAKA *et al.*, 2004; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

Outras substâncias de relaxamento derivadas do endotélio são os EDHFs. De acordo com Campbell e Harder (2001), seria uma substância capaz de promover o relaxamento vascular dependente do endotélio, sendo resistente a inibição combinada da NOS e COX, mas abolido por bloqueadores de canais para potássio (CAMPBELL; HARDER, 2001). Sendo assim, a atividade de um EDHF consiste em promover relaxamento dependente do endotélio em artérias tratadas com inibidores da NOS e COX e promove hiperpolarização do músculo liso vascular de forma depende do endotélio (CAMPBELL *et al.*, 2010).

Várias substâncias são candidatas a EDHF, sendo elas: os derivados do AA pela via da CYP, ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) (HECKER *et al.*, 1994; CAMPBELL *et al.*, 1996), anandamida (RANDALL *et al.*, 1996), íons potássio (K^+) (EDWARDS *et al.*, 1998), peptídeo natriurético C (CHAUHAN; HOBBS; AHLUWALIA, 2004), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MATOBA *et al.*, 2000, 2002; LUCCHESI; BELMADANI; MATROUGUI, 2005), junções comunicantes (GRIFFITH; CHAYTOR; EDWARDS, 2004) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) (ZHAO *et al.*, 2001).

Em artérias coronárias, estudos têm demonstrado os EETs como fortes candidatos à EDHF (FISSLTHALER *et al.*, 1999; FLEMING, 2000). *In vivo*, EETs são rapidamente metabolizados a substâncias correspondentes ao ácido dihidroxiepoxieicosatrienoico (DHETs), com uma meia vida curta de aproximadamente 8 min (FANG *et al.*, 2004; SPECTOR *et al.*, 2004; VRIENS *et al.*, 2005). Diversas vias estão envolvidas na mediação da vasodilatação induzida por EETs, incluindo canais para K^+ dependentes de cálcio, junções comunicantes, eNOS e canais de receptores de potenciais transitórios (TRP). A via ou as vias exatas dependem do leito vascular, da espécie e/ou agonista utilizado, e podem ser dependentes do endotélio via canais para potássio dependentes de cálcio de pequena e intermediária condutância (IK_{Ca} e SK_{Ca} , respectivamente), canais TRP (VRIENS *et al.*, 2005; SONKUSARE *et al.*, 2012) levando à ativação da NOS (HERCULE *et al.*, 2009), ou por meio de um efeito de músculo liso via canais TRP ou um receptor acoplado à proteína G (GPCR), e via BK_{Ca} (MÄKI-PETÄJÄ *et al.*, 2015). O efluxo de K^+ e a hiperpolarização da membrana celular reduzem a probabilidade de abertura do canal para cálcio nas células musculares lisas e o relaxamento vascular ocorre como resultado da redução da concentração de cálcio

intracelular (NELSON *et al.*, 1990; BOLTON *et al.*, 2002; VALLE-RODRIGUEZ; LÓPEZ-BARNEO; UREÑA, 2003).

Outro possível candidato a EDHF é o H_2O_2 (MATOBA *et al.*, 2000, 2002, 2003; MORIKAWA *et al.*, 2003), que uma vez formado, promove vasodilatação por diferentes mecanismos, incluindo cGMP nas artérias pulmonares bovinas (BURKE; WOLIN, 1987), cicloxigenase e cAMP em artérias cerebrais caninas (IIDA; KATUSIC, 2000) e PLA_2 em microvasos coronarianos porcos (BARLOW; EL-MOWAFY; WHITE, 2000). O H_2O_2 exógeno também causa vasodilatação, abrindo vários canais para K^+ , incluindo os canais K_{ATP} nas artérias cerebrais do gato cerebral (WEI; KONTOS; BECKMAN, 1996) e do mesentério de coelho (HATTORI *et al.*, 2003) e os canais para potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) nas artérias cerebrais de rato (SOBEY; HEISTAD; FARACI, 1997).

Diante desses mecanismos vasoativos conhecidos, tem sido demonstrado que em modelos animais de ambos os sexos, a progesterona por meio de ações extranucleares (não clássicas) pode agir nos vasos, estimulando a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (ZHANG, *et al.*, 2002; CUTINI; SELLÉS; MASSHEIMER, 2009). Em aorta de ratos (SELLES *et al.*, 2001), porcos e ovelhas (ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008), a progesterona causou um aumento na atividade da eNOS que está associada com a produção de fatores vasodilatadores derivados do endotélio, tais como NO (SELLES *et al.*, 2001; SIMONCINI. *et al.*, 2007; ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008) e EDHF (MATOBA *et al.*, 2000), e aumento fatores vasodilatadores derivados do AA, tais como PGI_2 (CUTINI; CAMPELO; MASSHEIMER, 2014). Além das ações endoteliais, a progesterona é também capaz de interagir com o músculo liso vascular promovendo uma rápida diminuição do influxo de Ca^{2+} em coelhos, porcos e humanos (MURPHY; KHALIL, 1999; MINSHALL *et al.*, 2002; CAIRRÃO *et al.*, 2012). Em conjunto, esses dados sugerem um potencial efeito vasodilatador exercido pela progesterona. Entretanto, os mecanismos envolvidos na modulação do tônus vascular pela progesterona ainda não estão totalmente elucidados, fato que torna relevante a busca por esclarecimentos acerca do papel que a progesterona exerce nos vasos.

Estudos conduzidos com o intuito de avaliar a ação aguda da progesterona nos diferentes sexos são escassos, principalmente no que se refere ao leito vascular coronariano. Elucidar os mecanismos envolvidos na ação da progesterona, pode prover base para um melhor entendimento de seus efeitos nos vasos, especialmente na circulação coronariana. Nossa hipótese é que a progesterona exerça um efeito vasodilatador no leito coronariano. Assim, com a finalidade de testar nossa hipótese, o objetivo deste estudo foi avaliar as ações agudas da progesterona afim de esclarecer esses efeitos e apontar possíveis diferenças sexuais envolvidas nesta ação na circulação coronariana de ratos de ambos os sexos.



OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito agudo da progesterona sobre o leito vascular coronariano em ambos os sexos de ratos normotensos, bem como avaliar os possíveis mediadores endoteliais envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as possíveis diferenças sexuais na ação da progesterona no leito vascular coronariano;
- Verificar a ação da progesterona no leito vascular coronariano mediante as diferentes fases do ciclo estral em ratas;
- Avaliar a ação da progesterona sobre a liberação dos principais mediadores endoteliais de relaxamento (NO, PGI₂ e EDHF);
- Verificar a participação de O₂^{•-} e H₂O₂ na ação da progesterona sobre o leito vascular coronariano de ratos de ambos os sexos;
- Verificar a participação dos receptores nucleares de progesterona (PR-A, PR-B) e do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) na ação da progesterona em ratos de ambos os sexos;
- Verificar a formação de NO mediante administração de progesterona em artérias coronárias;
- Verificar a formação de espécies reativas de oxigênio (O₂^{•-} e H₂O₂) mediante administração de progesterona em artérias coronárias.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) de ambos os sexos, divididos em dois grupos, com idade de 10 a 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas que permitiram ao animal o livre acesso à ingestão de água e ração em condições controladas de temperatura (20-24 °C) e umidade (40-60 %), com um ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) sob o número 64/2017.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em dois grupos: Fêmea e Macho

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Esfregaço vaginal

O ciclo estral das fêmeas foi monitorado por meio de esfregaços vaginais. As células epiteliais vaginais foram coletadas diariamente entre 8 e 9 horas a.m. e foram examinadas de acordo com o protocolo de Marcondes *et al.* (2002). Os machos foram submetidos ao mesmo manuseio diário para reproduzir o possível estresse sofrido pelas fêmeas durante a coleta. A identificação das fases do ciclo estral ocorreu de acordo com a figura 4. Optamos por realizar os protocolos apenas com as fêmeas que estavam no diestro II, fase com concentração basal de hormônios femininos (BERNARD; WOODRUFF, 2001; GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007), para que fossem mantidas as mesmas condições experimentais.

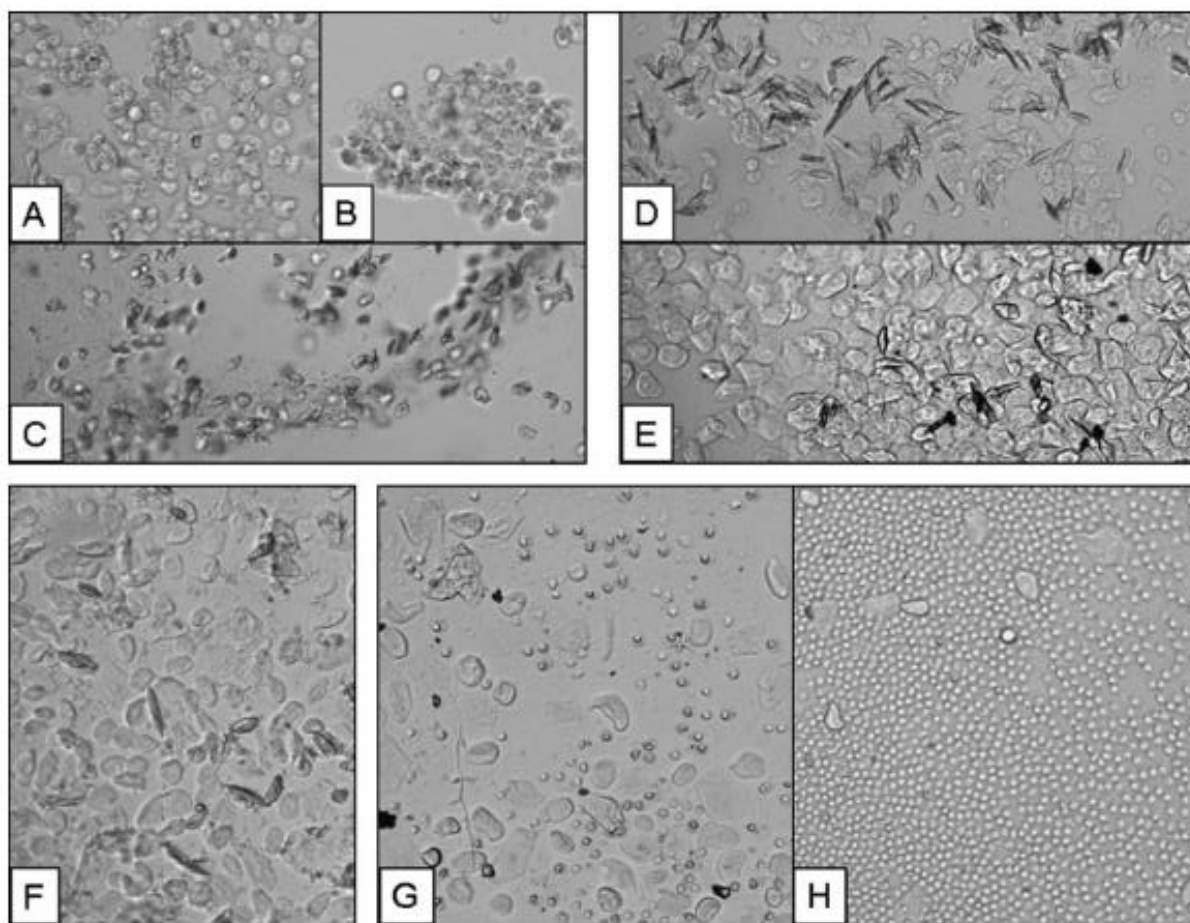


Figura 4: Representação do fluido vaginal seco não marcado obtido em diferentes dias do ciclo estral de ratos. A, B: Proestro; células tendem a aparecer em aglomerados e têm uma aparência granular. C: Proestro; as células podem alternativamente estar presentes como cadeias. D: Estro; células queratinizadas clássicas, semelhantes a agulhas. E: Estro; células podem aparecer alternativamente arredondadas, com bordas irregulares. F: Metaestro ou diestro I; uma combinação de "células de pavimento" redondas, algumas células semelhantes a agulhas e alguns leucócitos menores podem estar presentes durante um período de transição durante a primeira porção do primeiro dia de diestro. G: Diestro ou diestro II; os leucócitos podem aparecer em combinação com várias células arredondadas maiores. H: Diestro ou diestro II; esfregaço leucocitário clássico com algumas células epiteliais redondas maiores (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007).

3.3.2 Reatividade Vascular

Os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/Kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/Kg, *i.p.*). O tórax foi aberto, o coração foi dissecado de suas conexões e imediatamente transferido para o aparelho de perfusão, onde se canulou a aorta, ao nível de sua curvatura. Em seguida, iniciou-se a perfusão retrógrada pelo método de Langendorff previamente descrito com algumas modificações (SANTOS *et al.*, 2004; DEBORTOLI *et al.*, 2017).

Resumidamente, para perfusão foi utilizada a solução nutritiva modificada, composta de: NaCl, 120 mM; CaCl₂·H₂O, 1,25 mM; KCl, 5,4 mM; MgSO₄·7H₂O, 2,5 mM; NaH₂PO₄·H₂O, 2,0 mM; NaHCO₃, 27,0 mM; Na₂SO₄, 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37 °C por um banho maria, e continuamente aerada com mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂) na câmara de saturação de oxigênio, mantendo o pH estável em 7.4. O fluxo foi mantido constante em 10 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (Hugo Sachs, Germany). A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi mantida por meio de um balão de látex, preenchido com água, que ainda vazio foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão (AD Instruments MLT0380/A Reusable BP Transducer). O volume do balão foi ajustado por uma seringa de vidro (2 mL), de forma a se controlar a pressão diastólica intraventricular em torno de 10 mmHg. A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi avaliada usando um transdutor de pressão (AD Instruments MLT0380/A Reusable BP Transducer) conectado imediatamente próximo à cânula de perfusão aórtica, por meio do qual foi perfundido o leito coronariano.

Os dados gerados pelos transdutores de pressão foram registrados por um sistema de aquisição de dados (PowerLab System). Como o fluxo foi mantido constante, as alterações na pressão de perfusão puderam ser diretamente relacionadas as mudanças na resistência vascular. Após 40 minutos de estabilização, a PPC foi determinada e uma curva dose resposta de progesterona foi administrada *in bolus* em concentrações crescentes (1 – 50 µM) antes e após inibição individual ou combinada de possíveis fatores envolvidos na resposta da progesterona.

Todos os inibidores e bloqueadores foram perfundidos durante pelo menos 20 minutos e depois a curva dose-resposta da progesterona foi repetida como demonstrado na figura 5. A resposta vasodilatadora foi expressa como o percentual de relaxamento e calculada pela seguinte equação:

$$\Delta \% = \left(\frac{\text{PPC antes da infusão} - \text{PPC após a infusão}}{\text{PPC antes da infusão}} \right) * 100$$

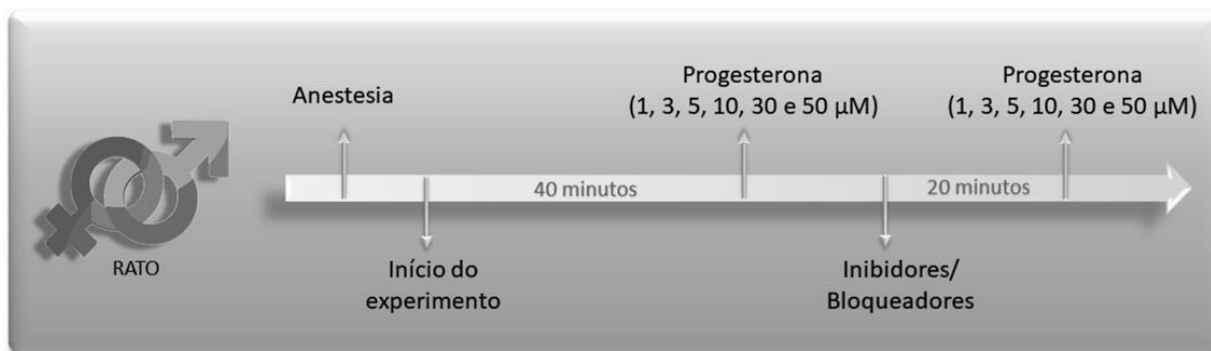


Figura 5: Esquema representativo do protocolo experimental de reatividade vascular.

3.3.2.1 Protocolos realizados

- Com o intuito de avaliar a resposta vasodilatadora da progesterona nas fases diferentes do ciclo estral de fêmeas, a curva dose-resposta de progesterona foi administrada no leito coronariano de ratas nas fases proestro, estro, diestro I (metaestro) e diestro II;
- Com intuito de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, um inibidor inespecífico da NOS, N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μM), foi adicionado à solução de perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação de PGI₂ na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, um inibidor inespecífico da COX, indometacina (2,8 μM), foi adicionado à solução de perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação de EDHFs na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, foi realizada inibição combinada de NOS e COX, com L-NAME (100 μM) e indometacina (2,8 μM) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;

- Com intuito de avaliar a participação dos EETs como EDHFs na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, foi realizada inibição combinada de NOS, COX e CYP com L-NAME (100 μ M), indometacina (2,8 μ M) e clotrimazol (0,75 μ M) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação de H_2O_2 como EDHFs na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, foi realizada inibição combinada de NOS, COX e degradação de H_2O_2 com L-NAME (100 μ M), indometacina (2,8 μ M) e catalase (1000 u/mL) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação de $O_2^{\bullet-}$ na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, um *scavenger* para $O_2^{\bullet-}$, Tiron (1 mM), foi adicionado à solução de perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação da NADPH oxidase (NOX) na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, um inibidor da NOX, apocinina (30 μ M), foi adicionado à solução de perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação de PR-A e PR-B na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, bloqueador de PR-A e PR-B, mifepristona (1 μ M), foi adicionado à solução de perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;
- Com intuito de avaliar a participação do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, antagonista do GPER, G36 (1 μ M), foi adicionado à solução de

perfusão por pelo menos 20 minutos antes que a curva de progesterona fosse repetida;

- Com intuito de avaliar qualquer efeito de taquifilaxia na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano, foi administrada uma segunda curva de progesterona após 20 minutos sem qualquer perfusão com inibidores e/ou bloqueadores.

3.3.3 Dissecção de artérias coronárias

A dissecção de artérias coronárias foi realizada de acordo com Debortoli *et al.* (2017). Os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/Kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/Kg, *i.p.*). O tórax foi aberto, o coração foi dissecado de suas conexões e mantido em solução nutritiva modificada, composta de: NaCl, 120 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM; KCl, 5.4 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.0 mM; NaHCO_3 , 27.0 mM; Na_2SO_4 , 1.2 mM; EDTA, 0.03 mM e glicose 11.0 mM, durante o procedimento de dissecção. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e septal foram isolados, com o auxílio de um estereomicroscópio (BEL Photonics, SZ-B LED, São Paulo, Brasil), livres de tecido muscular ventricular circundante e congelados em líquido de crioproteção (Tissue Tek - OCT) a -80°C até sua utilização.

3.3.4 Diamonofluoresceína (DAF-2)

Para avaliação da produção de NO, após realização dos cortes das artérias coronárias (10 μm), as lâminas foram incubadas com o corante fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DAF-2 é uma sonda de permeabilidade à membrana não fluorescente, reage com NO e produz DAF-2T, um derivado fluorescente. Assim, o início de uma resposta fluorescente, observada por um microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 515 e 500 nm, respectivamente, é indicativo da formação de NO (KOJIMA *et al.*, 1999; HETRICK; SCHOENFISCH, 2009).

O protocolo foi realizado de acordo Costa *et al.* (2018) com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 6 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DAF-2 (10 μ M) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de NO. A segunda lâmina foi incubada com DAF-2 + L-NAME (300 μ M) por 30 minutos sendo um controle negativo para a produção de NO. A terceira lâmina foi incubada com DAF-2 + progesterona (50 μ M), por 30 minutos, para investigar se a incubação com progesterona induzia alteração na produção de NO. A quarta lâmina foi incubada com L-NAME (300 μ M) por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com DAF-2 + progesterona, sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente de NO. Para testar a viabilidade dos vasos a sexta lâmina foi incubada com DAF-2 + Acetilcolina (ACh, 10 μ M) por 30 minutos e posteriormente, a sétima e última lâmina foi incubada com L-NAME por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com DAF-2 + ACh, sendo um controle negativo.

Foram obtidas imagens digitais na objetiva de 40x, o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 3 cortes de cada animal foram analisados. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

3.3.5 Dihidroetídio (DHE)

Após realização dos cortes das artérias coronárias (10 μ m), as lâminas foram incubadas com a sonda dihidroetidina (DHE; Invitrogen™), que é permeável à membrana celular. É postulado que o DHE reage com o superóxido e forma dois produtos fluorescentes, etídio e 2-hidroxi-etídio que se intercalam com o DNA da célula e podem ser visualizados com a fluorescência vermelha. Sendo assim, através de um microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de

518 e 605 nm, respectivamente, esta sonda é utilizada como um marcador indireto da presença de $O_2^{\bullet-}$ (FERNANDES *et al.*, 2007).

O protocolo foi realizado de acordo com Silva *et al.* (2016), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 6 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DHE (5 μ M) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de $O_2^{\bullet-}$. A segunda lâmina foi incubada com DHE + Tiron (10 μ M), por 30 minutos, sendo um controle negativo da produção basal de $O_2^{\bullet-}$. A terceira lâmina foi incubada com DHE + progesterona (50 μ M) pelo mesmo tempo, para investigar se a incubação com progesterona induzia alteração na produção de $O_2^{\bullet-}$. A quarta lâmina foi incubada com Tiron por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com DHE + progesterona, sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente do $O_2^{\bullet-}$. A quinta lâmina foi incubada apenas com a progesterona, para observar se este produto produzia alguma fluorescência. Para testar a viabilidade dos vasos a quinta lâmina foi incubada com DHE + Angiotensina II (Ang II) por 30 minutos e posteriormente, a sexta e última lâmina foi incubada com Tiron por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com Ang II, sendo um controle negativo.

Foram obtidas imagens digitais na objetiva de 40x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 3 cortes de cada animal foram analisados. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

3.3.6. Diclorofluoresceína (DCF)

Após realização dos cortes das artérias coronárias (10 μ m), a análise da produção de H_2O_2 nas artérias coronárias através da microscopia de fluorescência foi realizada de maneira indireta, por meio da utilização da sonda 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA; Invitrogen™). O DCF-DA é uma sonda permeável à membrana

celular e não fluorescente. Entretanto, na presença de espécies reativas, especialmente o H_2O_2 , este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2', 7' - diclorofluoresceína (DCF) que permanece intracelular. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 480 e 530 nm, respectivamente.

O protocolo foi realizado de acordo com Somberg *et al.* (2017), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 6 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DCF (10 μ M) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de H_2O_2 . A segunda lâmina foi incubada DCF + catalase (1000 u/mL) pelo mesmo tempo, sendo um controle negativo para a produção basal de H_2O_2 . A terceira lâmina foi incubada com DCF + progesterona (50 μ M) pelo mesmo tempo, para investigar se a incubação com progesterona induzia alteração na produção de H_2O_2 . A quarta lâmina foi incubada com catalase por 30 min antes de passar por uma nova incubação com DCF + progesterona, sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente do H_2O_2 . Para testar a viabilidade dos vasos a quinta lâmina foi incubada com DCF + AngII por 30 minutos e posteriormente, a sexta e última lâmina foi incubada com Tiron por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com AngII, sendo um controle negativo.

Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 40x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 3 cortes de cada animal foram analisados. Foi utilizado número amostral de 4 animais por grupo experimental.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pelo programa estatístico Graph-PadPrism 6. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que a normalidade foi confirmada a comparação da PPC basal foi realizada por meio de *Student's t test* não pareado. Para a análise da resposta vasodilatadora a progesterona foi utilizada a análise de variância de uma e duas vias (*two-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. A área abaixo da curva foi avaliada por *Student's t test* pareado e não pareado. Para análise de fluorescência foi utilizada análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Foram considerados como significativos valores com $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 REATIVIDADE VASCULAR

4.1.1. Pressão de perfusão coronariana e diferença sexual

De acordo com a figura 6, pudemos observar a diferença da PPC basal entre os grupos Fêmea e Macho. As fêmeas apresentaram uma PPC basal mais elevada quando comparada aos machos (fêmea – F = $87,39 \pm 2,4$ mmHg vs. macho – M = $69,04 \pm 2,7$ mmHg). A tabela 1 resume a variação percentual do aumento da PPC após diferentes inibições, demonstrando dessa forma, a importância dos mediadores na manutenção do tônus basal sexo específico.

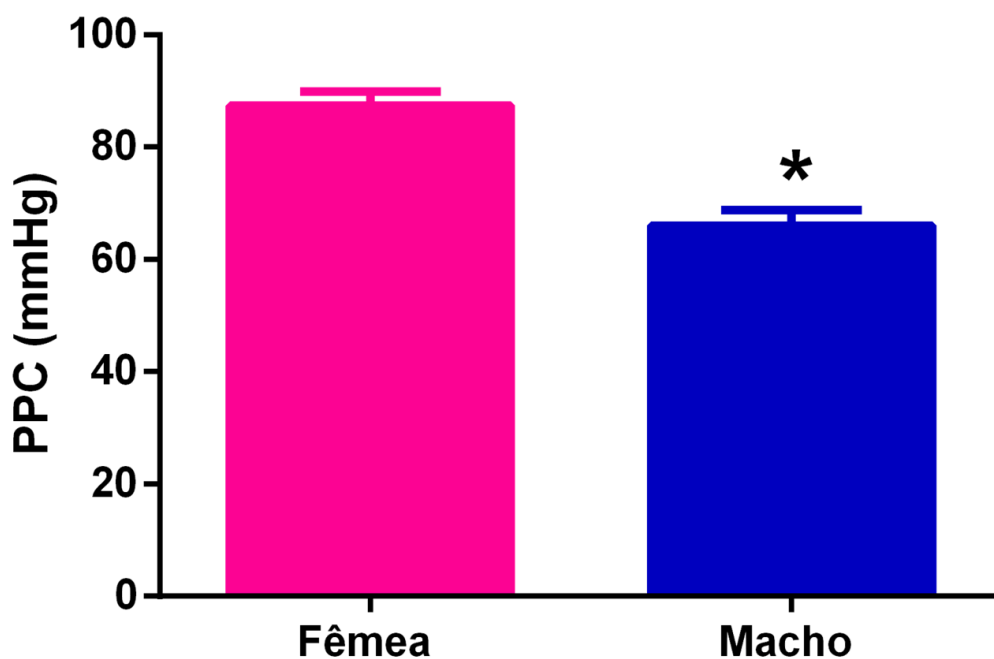


Figura 6: Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal dos grupos Fêmea (n = 39) e Macho (n = 29). Valores expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio de *Student's t test* não pareado. *p < 0,05 quando comparado ao grupo Fêmea.

Tabela 1: Variação percentual do aumento da PPC após utilização de diferentes inibidores.

| | L-NAME | | Indo | | L-NAME + Indo | | L-NAME + Indo + Clot | | L-NAME + Indo + Cat | |
|--------------|--------|--------|------|---------|---------------|---------------------|----------------------|--------|---------------------|-------------------------|
| | (n) | % | (n) | % | (n) | % | (n) | % | (n) | % |
| Fêmea | (7) | 68 ± 4 | (9) | 23 ± 7* | (8) | 50 ± 6 [#] | (9) | 40 ± 5 | (10) | 38 ± 6 |
| Macho | (8) | 58 ± 9 | (8) | 18 ± 3* | (8) | 38 ± 5 | (10) | 37 ± 9 | (7) | 100 ± 5 ^{*#†a} |

| | Tiron | | Apocinina | | Mife | | G36 | |
|--------------|-------|-------|-----------|--------|------|--------|-----|--------|
| | (n) | % | (n) | % | (n) | % | (n) | % |
| Fêmea | (9) | 8 ± 3 | (8) | 22 ± 5 | (9) | 17 ± 3 | (8) | 16 ± 2 |
| Macho | (9) | 2 ± 3 | (10) | 7 ± 8 | (9) | 10 ± 2 | (8) | 8 ± 5 |

Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de one-way ANOVA seguida do teste post hoc de Tukey e Student's t test não pareado. *P<0,05 comparado ao mesmo grupo na presença de L-NAME; [#]P<0,05 comparado ao mesmo grupo na presença de Indo; [†]P<0,05 comparado ao mesmo grupo na presença de L-NAME + Indo; ^aP<0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.

Podemos observar que, embora demonstrada diferença sexual na PPC basal, a vasodilatação induzida pela progesterona (figura 7) foi similar em ambos os grupos (F = 10,8 ± 1,1 %; M = 10,2 ± 1,7 %).

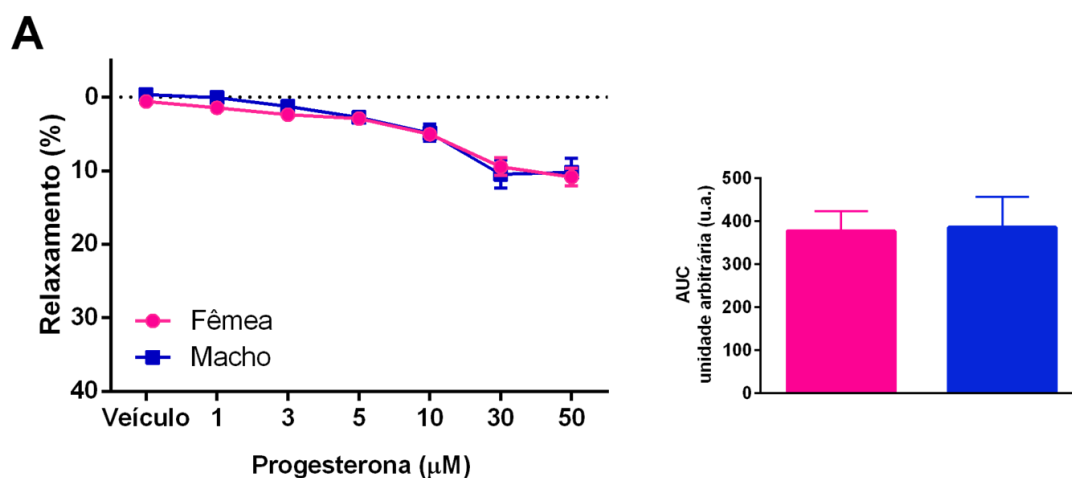


Figura 7: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) entre os grupos Fêmea (n = 10) e Macho (n = 9). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. A área abaixo da curva (AUC) foi analisada por *Student's t test* não pareado.

4.1.2 Influência do ciclo estral em resposta à progesterona

Na figura 8 podemos observar a curva de progesterona nas diferentes fases do ciclo estral do grupo fêmea. Não houve variação na reatividade em nenhuma das fases (proestro = $11,4 \pm 0,7$ %; estro = $12,2 \pm 1,3$ %; metaestro = $11,9 \pm 0,6$ %; diestro = $12,9 \pm 2,7$ %).

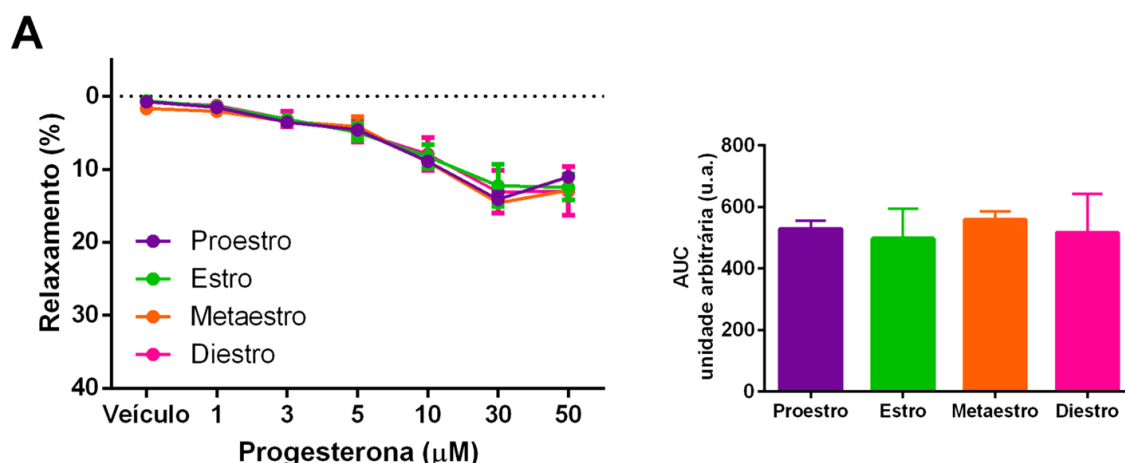


Figura 8: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 µM) entre as fases do ciclo estral: proestro (n = 6), estro (n = 6), metaestro (n = 3) e diestro (n = 5). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *one-way* e *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.1.3 Participação dos mediadores endoteliais em resposta à progesterona

Analizamos as possíveis vias endoteliais pelas quais a progesterona pode atuar, sendo elas a via de NO, prostanoídes e EDHF. Assim, o primeiro passo foi verificar a participação do NO nesta ação. Após a inibição da NOS, tanto fêmeas (figura 9.A, n = 8) quanto machos (figura 9.B, n = 9) tiveram a resposta vasodilatadora aumentada, quando comparada a seus respectivos controles ($F = 23,5 \pm 4,4$ %; $M = 26,6 \pm 3,4$ %).

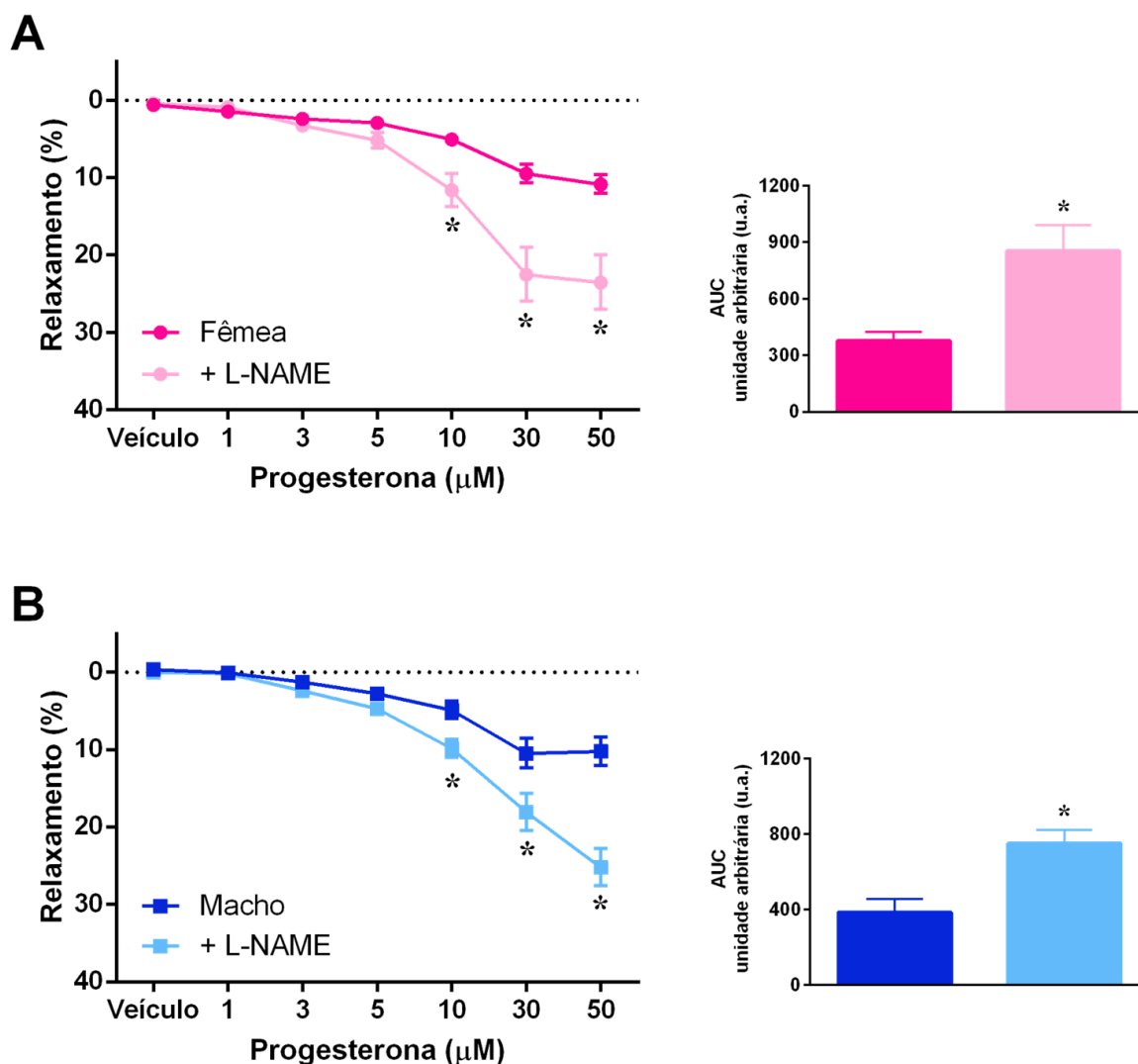


Figura 9: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com L-NAME (A – Fêmea, $n = 8$; B - Macho, $n = 9$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Após a inibição da síntese de prostanoídes (figura 10. A - F, $n = 7$; figura 10.B - M, $n = 8$), apenas os machos tiveram a resposta reduzida ($F = 11,5 \pm 2,4 \%$; $M = 4,3 \pm 1,0 \%$). Quando comparada a inibição sexo específica, podemos observar diferença na vasodilatação induzida pela progesterona.

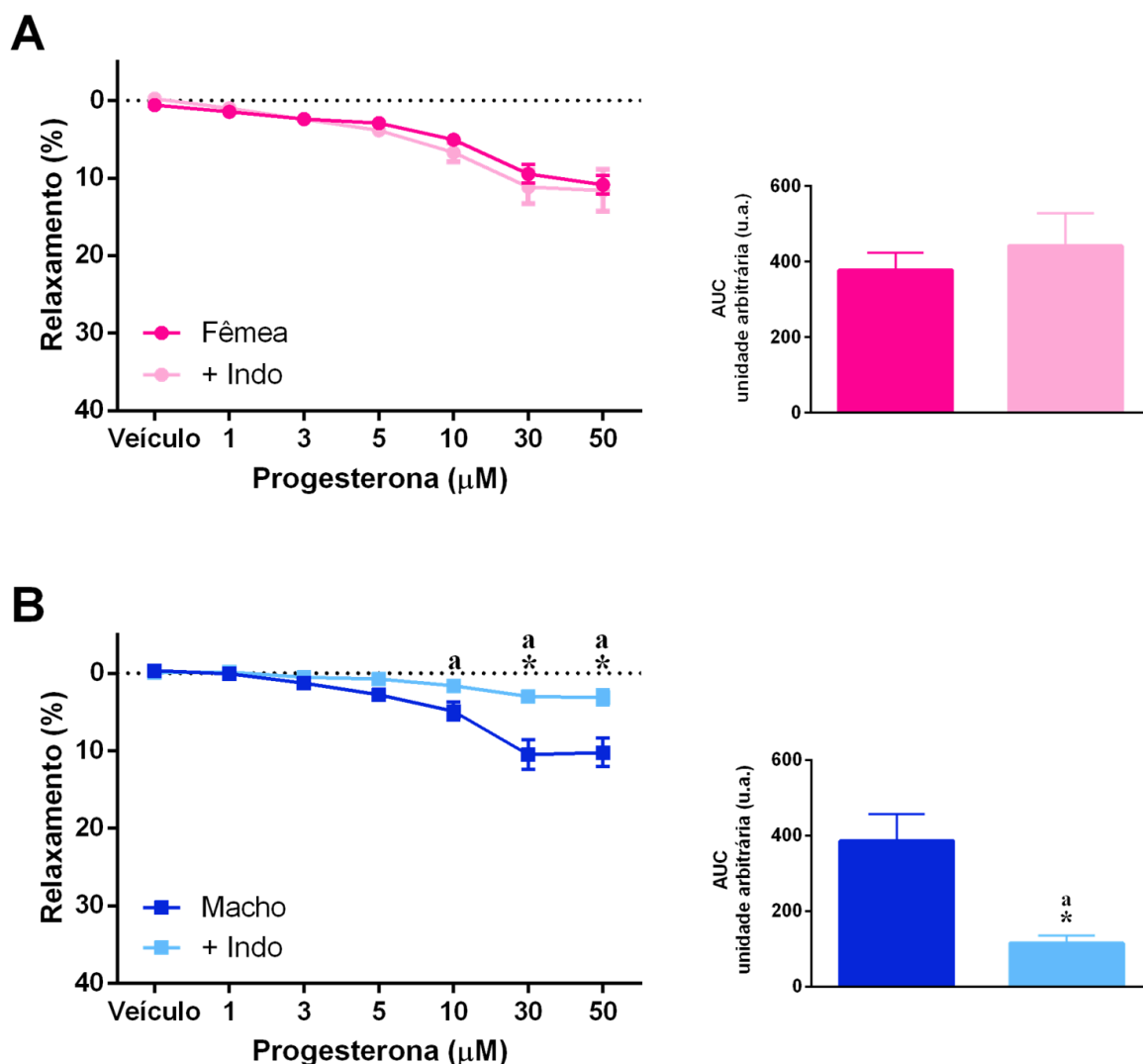


Figura 10: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com indometacina (A – Fêmea, $n = 8$; B - Macho, $n = 9$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.

A fim de identificar a participação de possível EDHF na resposta induzida pela progesterona, repetimos a curva de progesterona na presença de L-NAME + indometacina (figura 11.A - F = $19,6 \pm 2,9$ %; figura 11.B - M = $17,9 \pm 2,0$ %). Observamos que a inibição combinada também potencializou a resposta vasodilatadora da progesterona. Entretanto, nos machos, apesar de a resposta ter sido potencializada, essa foi menor que a observada no bloqueio individual com L-NAME.

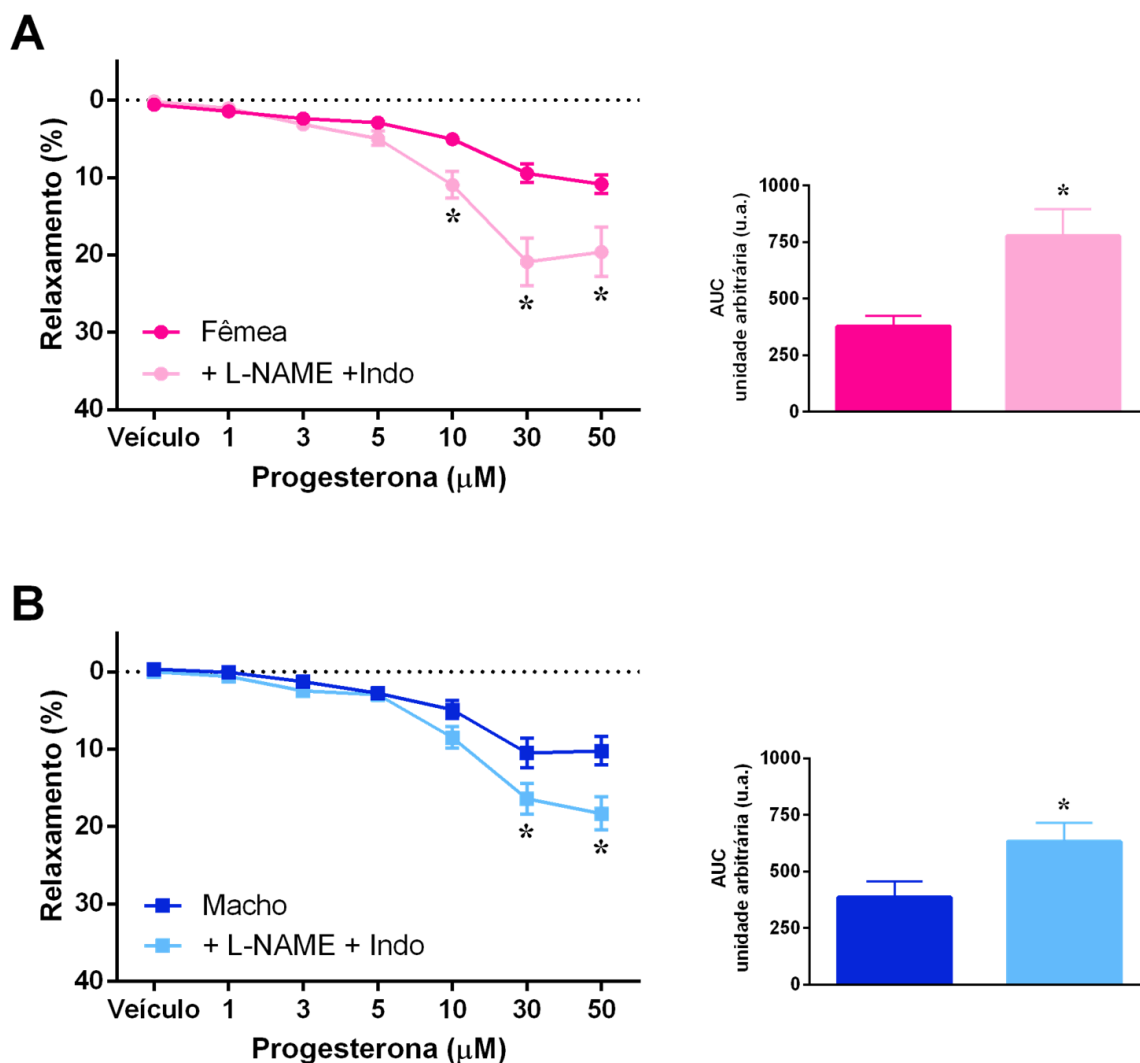


Figura 11: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina (A – Fêmea, $n = 8$; B - Macho $n = 8$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way ANOVA* seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Possíveis candidatos a EDHF nas coronárias de ratos são os EETs. Para analisar a participação desse metabólito da CYP foi realizada a curva de progesterona após a inibição combinada de L-NAME, indometacina e clotrimazol (figura 12). Tanto fêmeas quanto machos não apresentaram alteração na resposta.

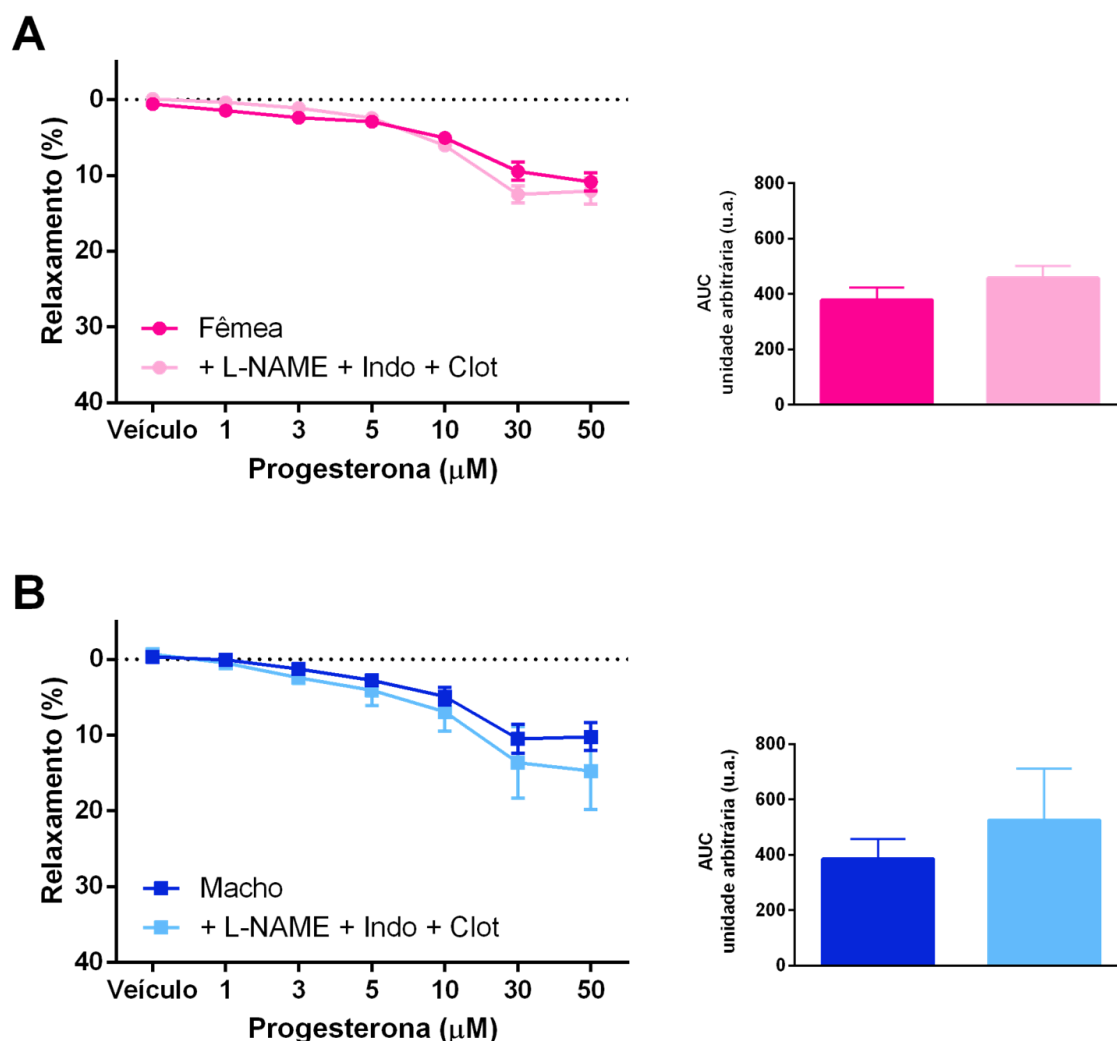


Figura 12: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina + Clotrimazol (C – Fêmea, $n = 8$; D - Macho, $n = 8$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado.

Visando analisar a participação de H_2O_2 como EDHF, foi realizada curva de progesterona após a inibição com L-NAME, indometacina e catalase. A resposta vasodilatadora à progesterona foi menor nas fêmeas, enquanto nos machos, não houve diferença (figura 13.A - F = $6,7 \pm 2,4$ %; figura 13.B - M = $17,0 \pm 2,6$ %). Além disso, pode-se observar diferença na vasodilatação à progesterona entre os sexos após a inibição.

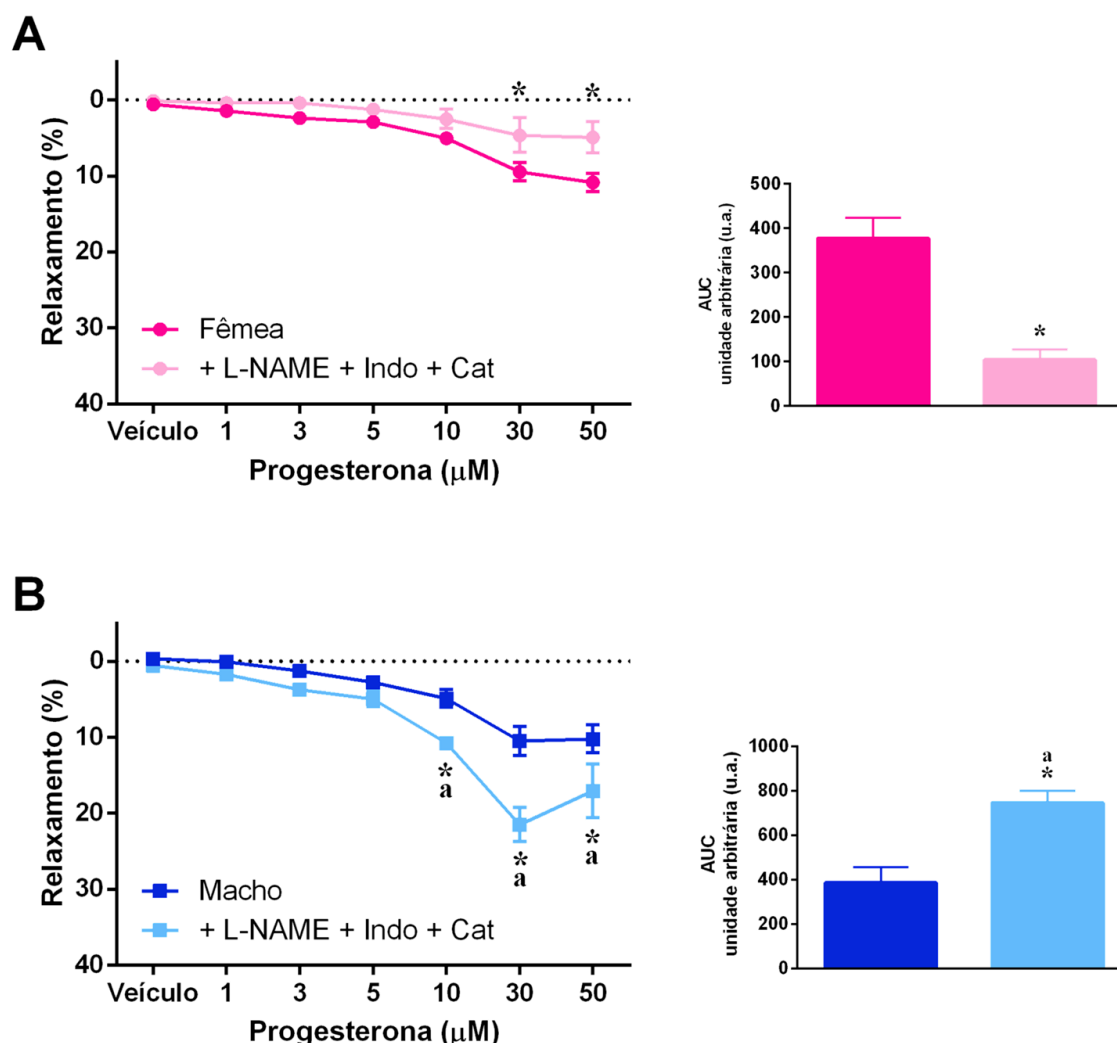


Figura 13: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com L-NAME + Indometacina + Catalase (C – Fêmea, n = 8; D - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.

4.1.4 Participação de espécies reativas de oxigênio em resposta à progesterona

Uma vez que a inibição da síntese de NO potencializou o efeito vasodilatador, sugerimos que a via de produção do NO poderia gerar metabólitos (por exemplo, $\text{O}_2^{\bullet-}$) que atuariam de forma a inibir a resposta induzida pela progesterona. Assim, verificamos o relaxamento após inibição com Tiron, *scavenger* para $\text{O}_2^{\bullet-}$. Nas fêmeas, após a adição de Tiron à solução de perfusão, o relaxamento foi reduzido, porém sem alteração nos machos (figura 14.A - F = $1,9 \pm 0,8$ %; figura 14.B - M = $9,0 \pm 1,9$ %). Além disso, foi observada diferença sexo específica após a perfusão com Tiron.

Também verificamos a participação de uma fonte geradora de $O_2^{\bullet-}$, NOX, no relaxamento induzido pela progesterona. Após a inibição deste complexo enzimático, com apocinina, as fêmeas tiveram a resposta a progesterona reduzida, a qual não foi alterada nos machos (figura 15.A - $F = 5,2 \pm 0,8 \%$; 15.B - $M = 8,3 \pm 1,6 \%$).

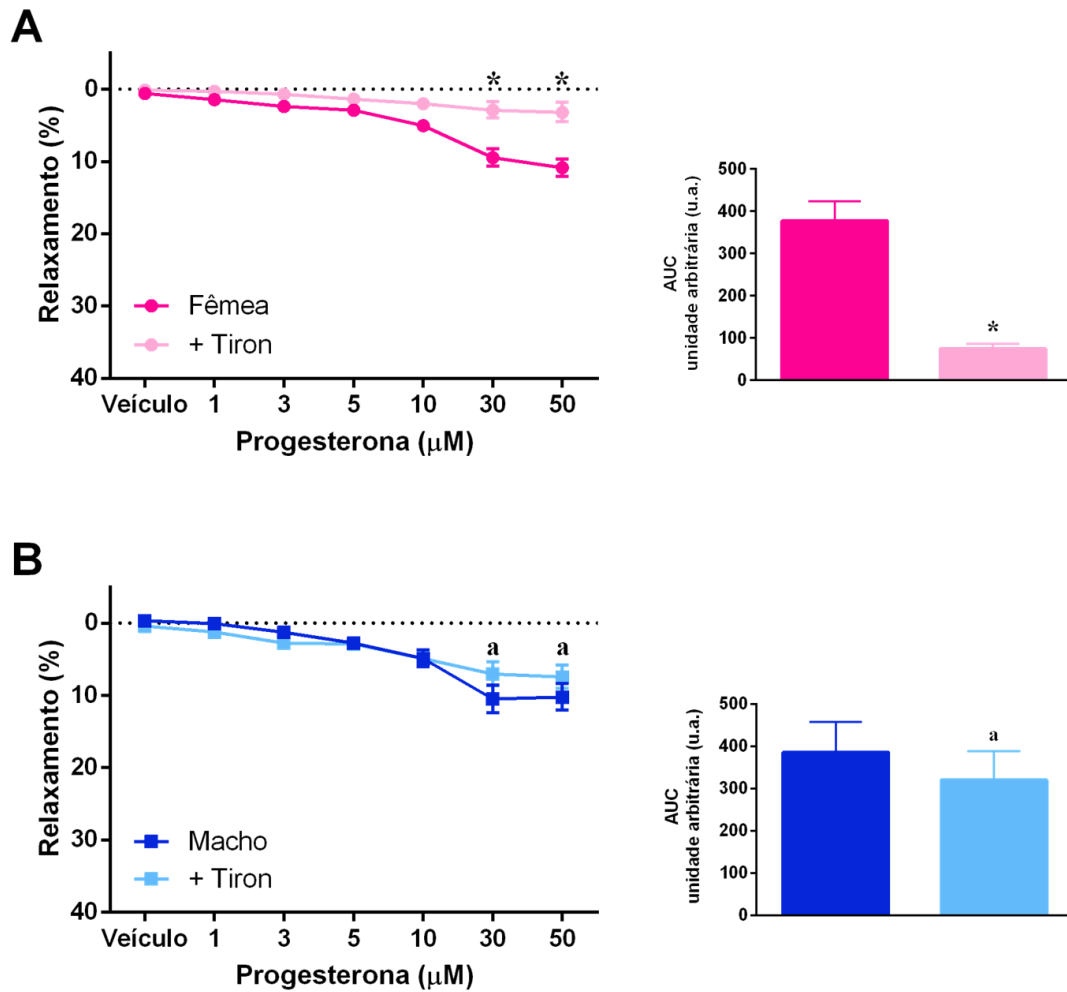


Figura 14: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com Tiron, (A - Fêmea, $n = 5$; B - Macho, $n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way ANOVA* seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.

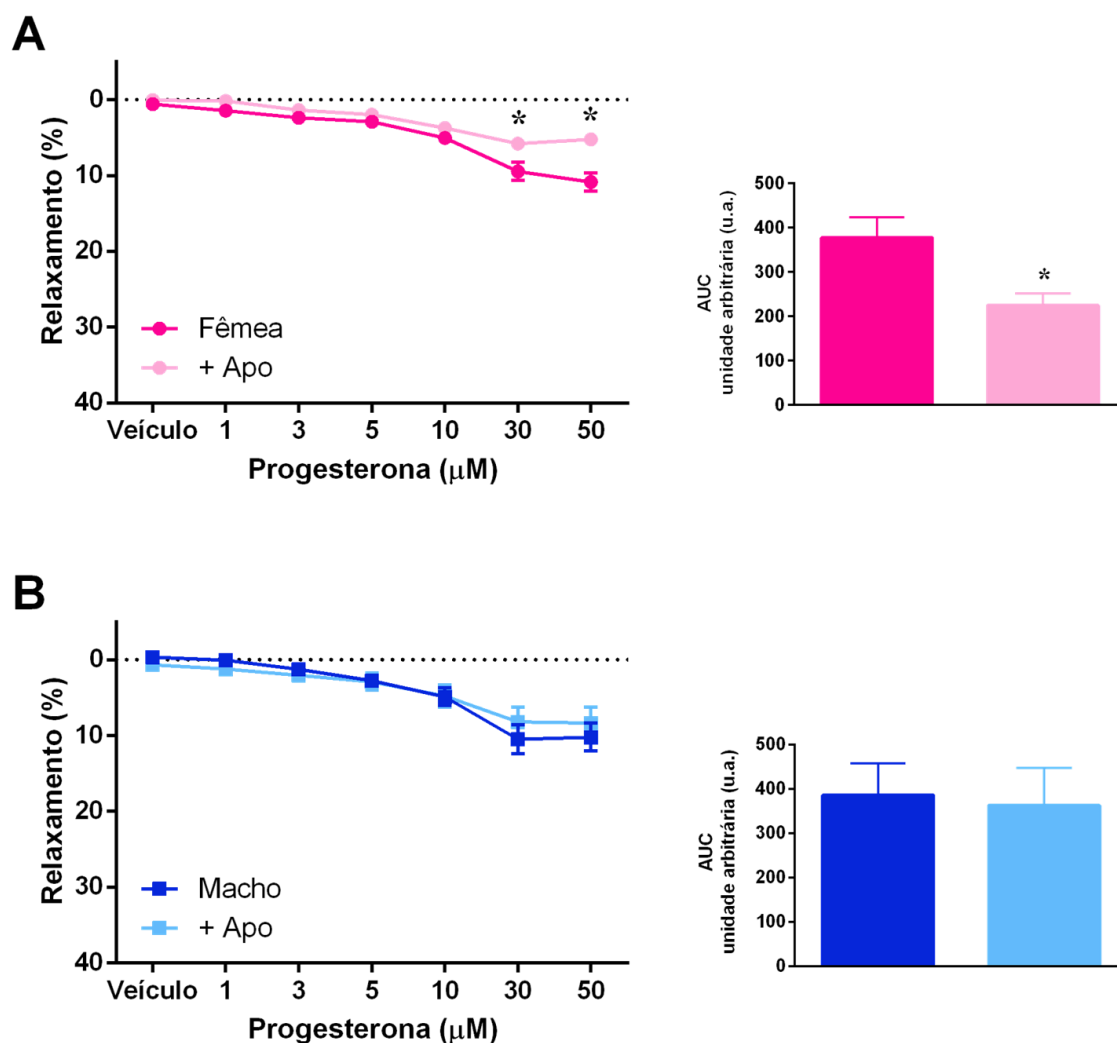


Figura 15: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com apocinina (C - Fêmea, $n = 8$.; D - Macho, $n = 7$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.1.5 Participação de possíveis receptores envolvidos na resposta da progesterona

Para analisar os possíveis receptores envolvidos na vasodilatação induzida pela progesterona, foi realizada a inibição dos receptores clássicos de progesterona, PR-A e PR-B (figura 16), com mifepristona. A resposta vasodilatadora induzida pela progesterona, mostrou-se atenuada apenas nas fêmeas ($F = 2,0 \pm 0,4 \%$; $M = 11,0 \pm 3,7 \%$). E pode-se observar diferença entre os sexos. Por outro lado, quando

realizamos o bloqueio do GPER ambos os grupos tiveram a resposta vasodilatadora abolida (figura 17.A - F = $0,4 \pm 0,1$ %; 17.B - M = $1,2 \pm 0,6$ %).

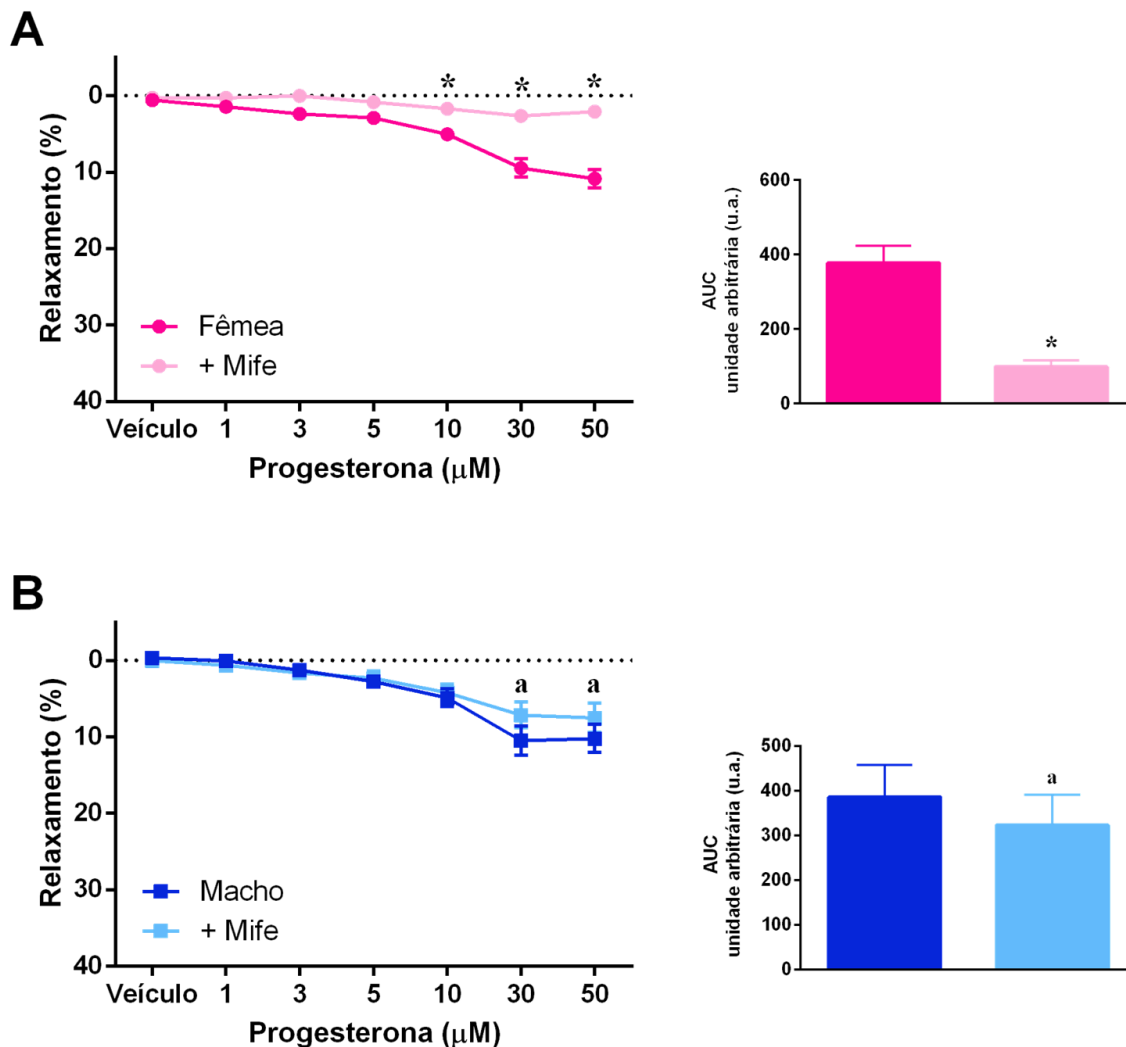


Figura 16: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μ M) antes e após inibição com mifepristona (A - Fêmea, n = 5; B - Macho, n = 6). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais.

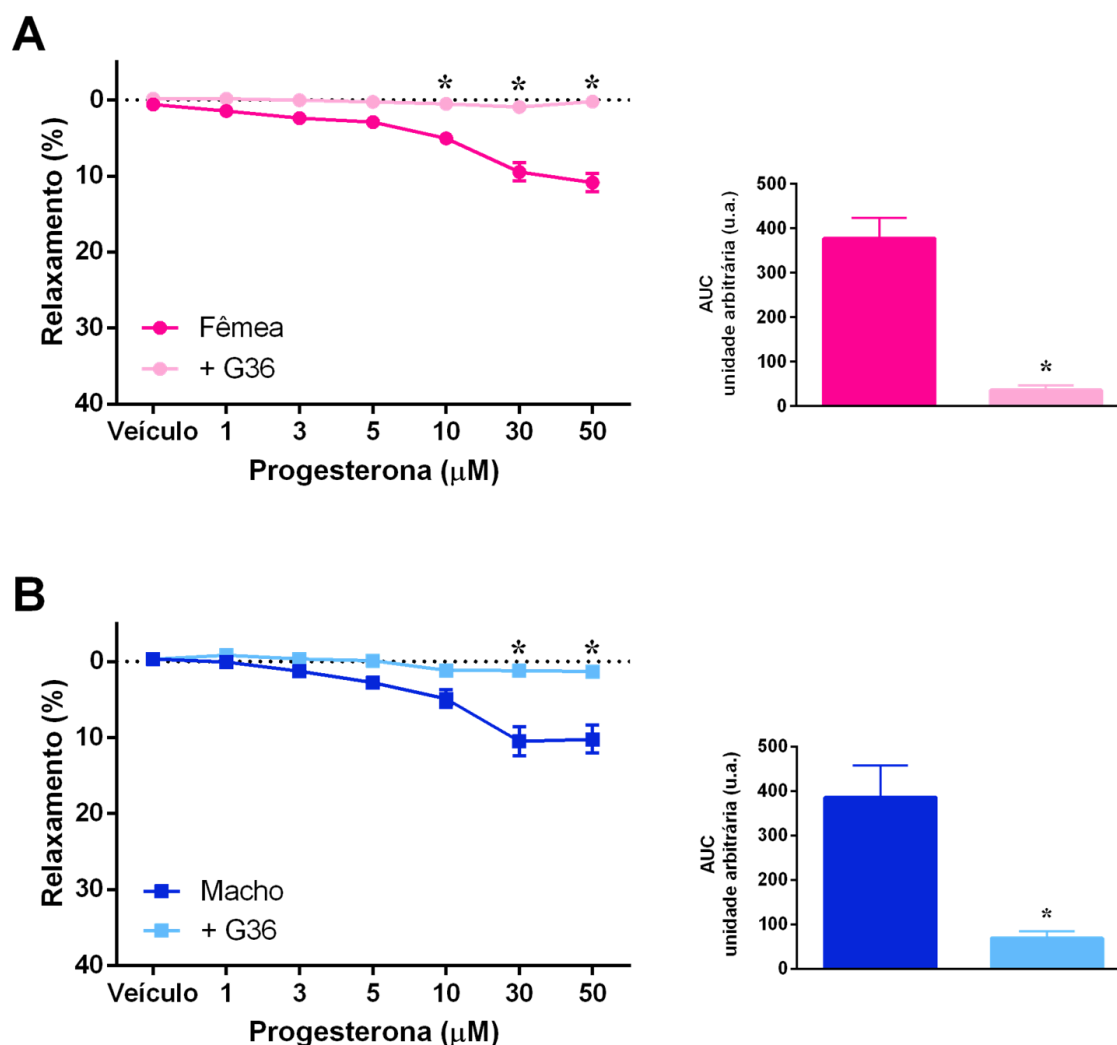


Figura 17: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após inibição com G36 (A - Fêmea, $n = 5$; B - Macho, $n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* não pareado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Para descartar a possibilidade de taquifilaxia realizamos uma segunda curva de progesterona 20 min após a primeira curva (figura 19). Podemos observar que não houve variação na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona em nenhum dos grupos estudados.

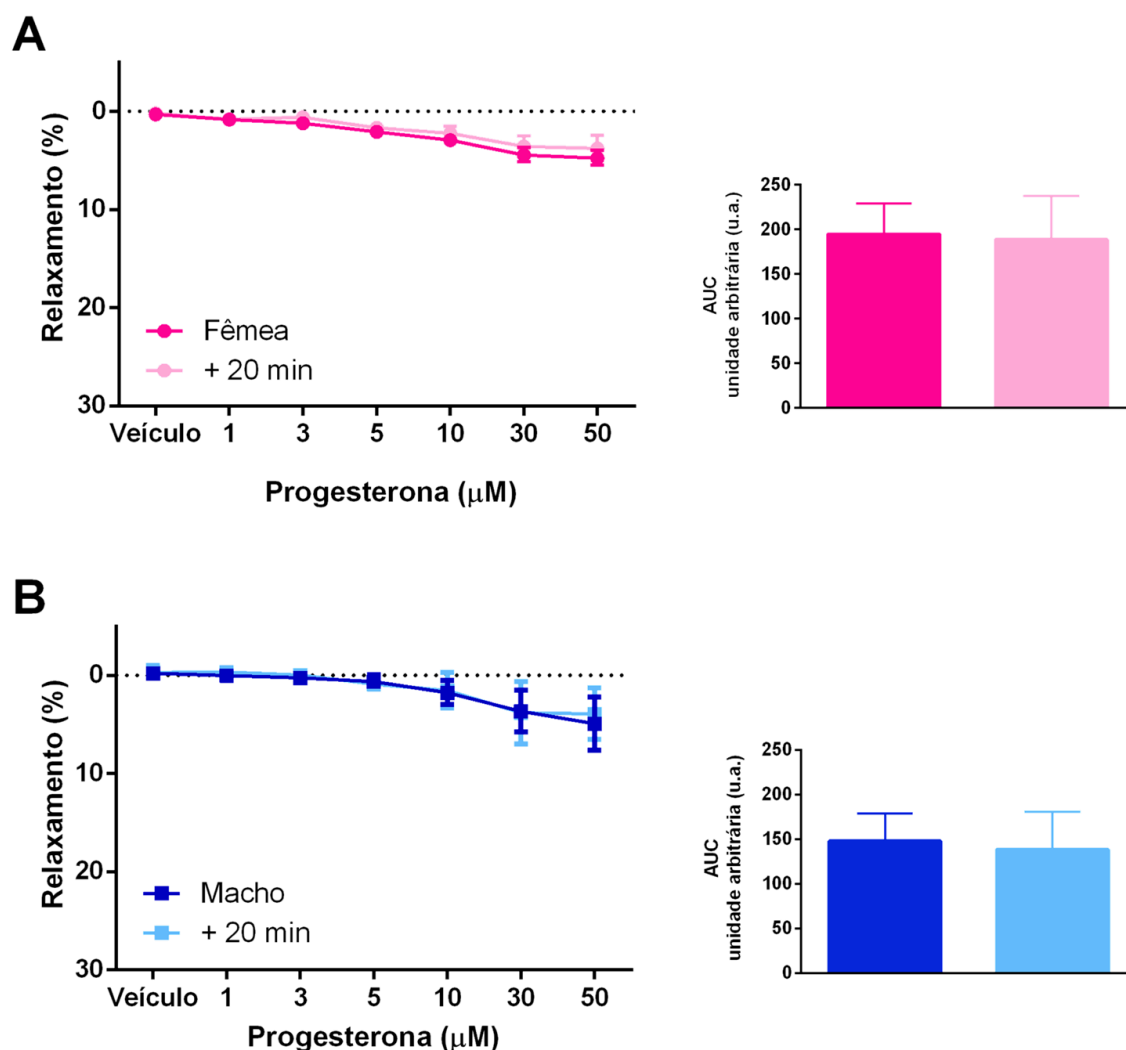


Figura 18: Resposta vasodilatadora a doses crescentes de progesterona (1 – 50 μM) antes e após 20 minutos de perfusão apenas com solução nutritora (A – Fêmea, $n = 8$; B - Macho, $n = 7$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way ANOVA* seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e *Student's t test* pareado.

4.1.6 Representação dos mediadores e receptores envolvidos na resposta da progesterona

A tabela 2 resume a participação dos mediadores e receptores envolvidos na vasodilatação induzida pela progesterona sexo específico. Podemos observar que o NO, EETs e GPER participam da resposta tanto em fêmeas quanto em machos. Por outro lado, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e PRs tem participação apenas em fêmeas, enquanto prostanoídes apenas em machos.

Tabela 2: Classificação representativa dos mediadores e receptores envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela progesterona no leito coronariano.

| Mediadores/ Receptores | Fêmea | Macho |
|-------------------------------|-------|-------|
| NO | + | + |
| Prostanóides | - | + |
| EETs | + | + |
| H ₂ O ₂ | + | - |
| O ₂ ^{•-} | + | - |
| PRs | + | - |
| GPER | + | + |

+ participação; - não participação

4.2 NÍVEIS VASCULARES DE NO, $O_2^{\bullet-}$ E H_2O_2

Os níveis de NO foram mensurados pela produção de fluorescência emitida por DAF-2 (figura 19). Em condições basais (ausência de estímulos), a análise fluorescência revelou maior produção de NO em machos que em fêmeas. Esse resultado se manteve mesmo após a estimulação com progesterona, tendo os machos maior produção de NO que as fêmeas. Embora haja essa diferença entre os sexos, ambos os grupos tiveram a fluorescência aumentada após o estímulo com progesterona.

Em condições basais (ausência de estímulos), a produção de fluorescência emitida da oxidação do DHE por $O_2^{\bullet-}$, em artérias coronarianas, mostrou-se maior no grupo Macho quando comparado ao grupo Fêmea (figura 20). Após a estimulação com progesterona, a fluorescência produzida foi aumentada nas fêmeas quando comparadas ao basal, enquanto nos machos foi similar ao basal. Além disso, na presença de Tiron (*scavenger* para $O_2^{\bullet-}$), todos os grupos tiveram a resposta diminuída.

A análise dos níveis de H_2O_2 demonstrou que em condições basais (ausência de estímulos), a fluorescência emitida pelo DCF em artérias coronárias foi maior em fêmeas que em machos (figura 21). Após estimulação com progesterona, os níveis de fluorescência foram aumentados em ambos os sexos comparados as condições basais. Após estimulação com progesterona, os níveis de fluorescência foram aumentados em ambos os sexos comparados as condições basais. Não obstante, na presença de catalase os níveis de fluorescência foram diminuídos em todos os grupos.

A viabilidade dos vasos na análise de fluorescência emitida por DAF-2 foi testada mediante estímulo por ACh, controle positivo para formação de NO. Os resultados demonstraram que os vasos estavam viáveis, uma vez que a fluorescência foi aumentada após estímulo por ACh quando comparado as condições basais em ambos os sexos. Nas análises por DHE e DCF a viabilidade dos vasos foi testada por estímulo da Ang II, controle positivo para formação de espécies reativas. A fluorescência foi aumentada tanto em fêmeas quanto em machos confirmando que os vasos estavam viáveis.

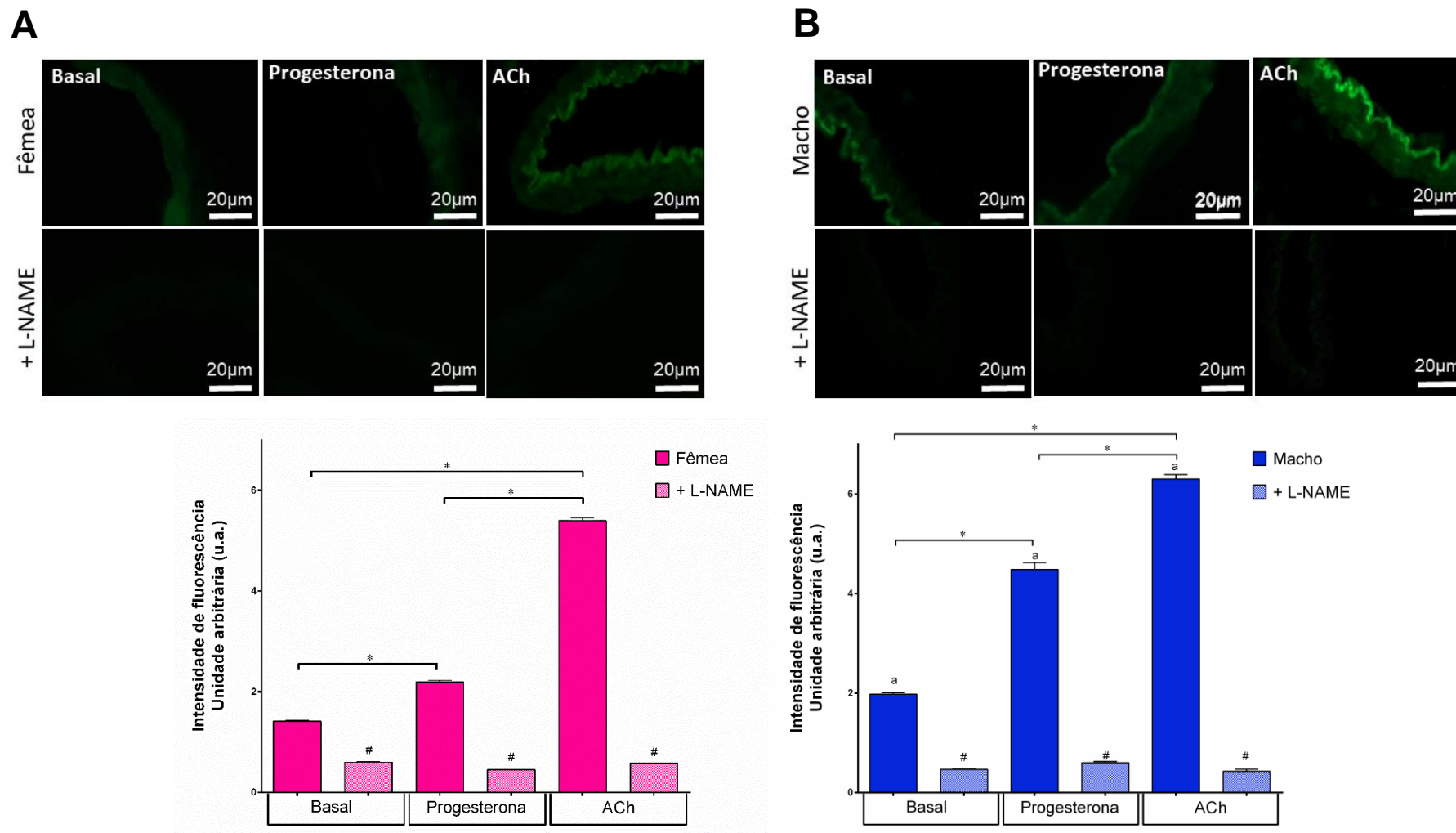


Figura 19: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DAF-2 em artérias coronárias de (A) fêmeas ($n = 4$) e (B) machos ($n = 4$) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm . Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$ comparado as mesmas condições experimentais na ausência de L-NAME. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

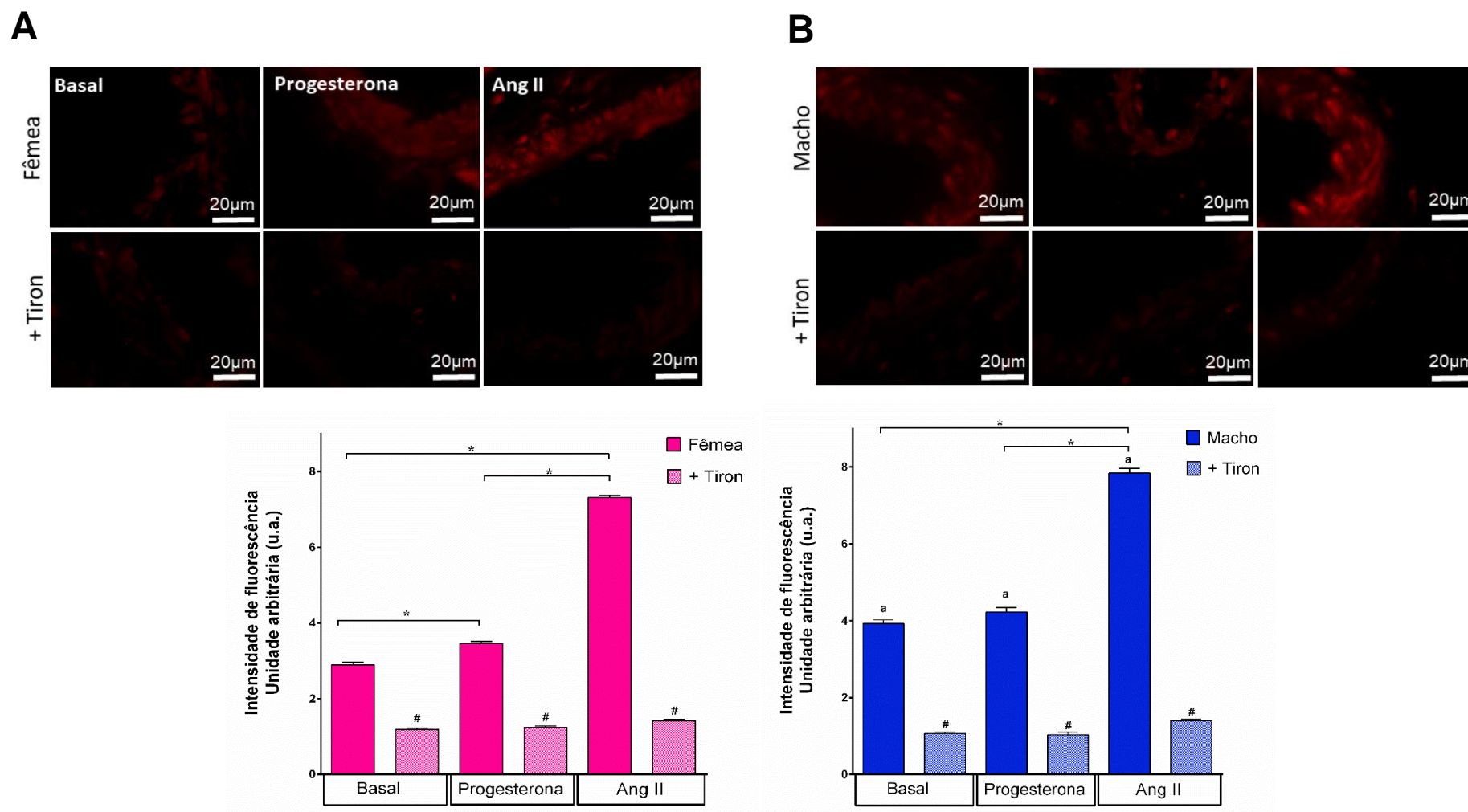


Figura 20: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DHE em artérias coronárias de (A) fêmeas (n = 4) e (B) machos (n = 4) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0,05. # p < 0,05 comparado as mesmas condições experimentais na ausência de Tiron. ^a p < 0,05 comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

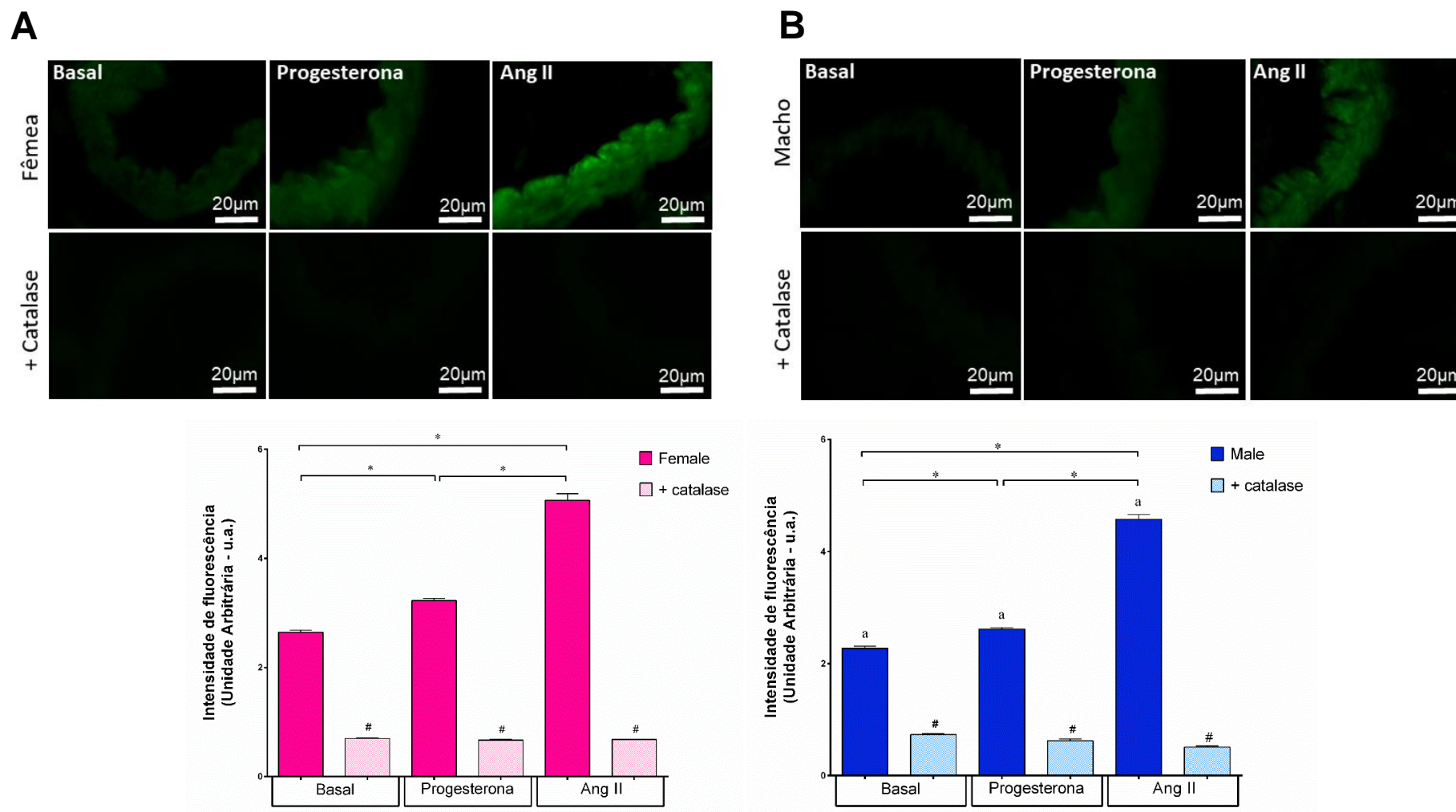


Figura 21: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por DCF em artérias coronárias de (A) fêmeas ($n = 4$) e (B) machos ($n = 4$) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm . Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$ comparado as mesmas condições experimentais na ausência de catalase. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo fêmea sob as mesmas condições experimentais. A análise estatística foi realizada por meio de *two-way* ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O principal achado desse estudo foi que a progesterona foi capaz de promover relaxamento no leito coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos e esse efeito foi similar em fêmeas e machos. Apesar de essa resposta ter sido similar, os mediadores envolvidos parecem ser diferentes em cada grupo.

Inicialmente confirmamos uma diferença na PPC basal entre fêmeas e machos, corroborando estudos prévios de nosso laboratório (MOYSÉS; BARKER; CABRAL, 2001; SANTOS *et al.*, 2004, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2012; DEBORTOLI *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais o tônus coronariano de ratas normotensas é mais elevado que dos machos ainda não são completamente elucidados. Experimentos com ratos gonadectomizados de ambos os sexos demonstraram que, após a castração a PPC é reduzida nas fêmeas, porém não sofre alteração nos machos. Após o tratamento com estrogênio, a PPC foi restaurada nas fêmeas e aumentada nos machos, para valores similares àqueles observados em fêmeas não gonadectomizadas (MOYSÉS; BARKER; CABRAL, 2001). Além disso, Santos *et al.* (2016) demonstraram que a castração não teve efeito na PPC de machos e reduziu a PPC basal em fêmeas, sugerindo um papel para os hormônios sexuais femininos na manutenção do tônus coronariano. Entretanto, estudos adicionais são necessários para determinar se esta elevação da PPC teria algum papel nos efeitos cardioprotetores dos estrógenos observados em fêmeas, bem como as possíveis vias envolvidas nessa resposta. Talvez uma PPC mais elevada permita maior vasodilatação quando o fornecimento de oxigênio e/ou nutrientes se torna reduzido (SANTOS *et al.*, 2016). De acordo com Figueroa-Valverde *et al.*, (2011), a infusão com estrogênio aumenta significativamente a PPC e a resistência vascular com corações isolados devido ao influxo de cálcio por ativação dos canais para cálcio do tipo-L via mecanismo molecular extra nuclear o que poderia justificar o tônus mais elevado (FIGUEROA-VALVERDE *et al.*, 2011).

Embora não tenha sido o objetivo deste estudo, a importância dos mediadores endoteliais, bem como outros fatores, para a manutenção tônus coronariano basal do

leito coronariano foi confirmada, corroborando dados prévios do nosso laboratório (SANTOS *et al.*, 2004, 2016; ROUVER *et al.*, 2015)

Ainda que a PPC basal das fêmeas tenha sido maior que dos machos, quando analisamos a reatividade vascular, observamos um efeito vasodilatador dose dependente da progesterona similar em ambos os sexos. Sabe-se que os hormônios sexuais podem modular a reatividade vascular coronariana e isso pode ser observado tanto pela ação do estrogênio (SANTOS *et al.*, 2004, 2016) como pela ação da testosterona em coronárias de rato (ROUVER *et al.*, 2015). Um crescente corpo de evidências indica que a progesterona também exerce importante efeito fisiológico rápido, com ações extra nucleares que regulam a vasodilatação e o tônus vascular (MINSHALL *et al.*, 2002; RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstram que a progesterona pode atuar também na modulação da resistência das artérias coronarianas em ambos os sexos, corroborando outros estudos em que a administração de progesterona causou vasodilatação tanto em fêmeas (MOLINARI *et al.*, 2001; MINSHALL *et al.*, 2002) quanto em machos (CAIRRÃO *et al.*, 2012).

Depois de verificar a capacidade de relaxamento induzido pela progesterona, analisamos as possíveis vias envolvidas nesta resposta no leito coronariano de ratos. Após a inibição da síntese de NO, com L-NAME, o efeito vasodilatador da progesterona foi potencializado em ambos os grupos. Outros estudos têm demonstrado que a progesterona causa um aumento agudo na atividade da eNOS em ovelhas, ratos e humanos, que foi associada com a produção de NO (RUPNOW *et al.*, 2001; SELLES *et al.*, 2001, 2002; SIMONCINI *et al.*, 2004; PANG; DONG; THOMAS, 2015), um potente vasodilatador (HANAFY; KRUMENACKER; MURAD, 2001). Nossos resultados sugerem que a via de formação do NO pode modular o relaxamento induzido pela progesterona, uma vez que após o estímulo com progesterona os níveis de NO foram aumentados tanto em fêmeas quanto em machos. Curiosamente, o envolvimento de NO no relaxamento induzido pela progesterona é estabelecido de uma forma negativa, uma vez que após a inibição de sua síntese a vasodilatação induzida pela progesterona foi aumentada.

Uma possível explicação para este resultado envolve a produção de $O_2^{\bullet-}$. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser proveniente de diversas fontes, dentre elas ação da NOS (STUEHR; POU;

ROSEN, 2001; MORIKAWA *et al.*, 2003), COX (TANG; VANHOUTTE, 2009) e NOX (TARAFDAR *et al.*, 2018). Uma vez formado, o $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer ação de enzimas antioxidantes, tais como a SOD, que atua na dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, forma H_2O_2 . Além disso, ele pode se ligar ao NO e formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (ZOU.; SHI; COHEN, 2002). Contudo, a formação do $ONOO^-$ ocorre de 3 a 4 vezes mais rápido que a formação de H_2O_2 (KERR *et al.*, 1999). Não obstante, o $O_2^{\bullet-}$, por si só, pode agir diretamente como vasoconstritor aumentando a sensibilidade ao Ca^{2+} e induzir contração arterial (KNOCK *et al.*, 2009) ou indiretamente diminuindo a biodisponibilidade de NO (ZOU; SHI; COHEN, 2002).

O $ONOO^-$ é formado pela oxidação do NO pelo $O_2^{\bullet-}$, e pode agir inibindo a síntese de fatores de relaxamento derivados do endotélio, uma vez que pode interferir negativamente na produção de substratos requeridos para formação de NO (por exemplo: BH_4), que conseqüentemente resulta no aumento da síntese de $O_2^{\bullet-}$ em vez de NO pela NOS (LAURSEN *et al.*, 2001; SATOH *et al.*, 2005). Ademais, mesmo em pequenas concentrações (0.01 μM) $ONOO^-$ é capaz de inibir a síntese de PGI_2 (ZOU; ULLRICH, 1996) e também prejudicar a vasodilatação mediada por EDHF, pelo fato de reduzir a atividade dos canais para K^+ (LIU *et al.*, 2002).

Assim, nós acreditamos que a progesterona pode estimular a síntese de NO, resultando na formação de $ONOO^-$, que pode agir prejudicando a síntese de NO e PGI_2 , pela NOS e COX respectivamente, e prejudicar os efeitos do EDHF. Nesse contexto, a ausência de NO (para formação de $ONOO^-$) permite que o efeito da progesterona seja aumentado. De fato, após a estimulação com progesterona os níveis de $O_2^{\bullet-}$ ficaram elevados em artérias coronárias de fêmeas. Desta forma, a produção de NO em resposta a progesterona justificaria a formação de $ONOO^-$. Os machos, em contrapartida, não apresentaram alteração nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ após o estímulo com progesterona. Entretanto, mesmo em condições basais, os níveis de $O_2^{\bullet-}$ em artérias coronárias de machos são maiores que nas fêmeas, corroborando estudo prévio de nosso laboratório (DEBORTOLI *et al.*, 2017). Isso poderia explicar o fato de ocorrer a formação de $ONOO^-$ neste grupo após o estímulo de progesterona.

Outro possível mediador endotelial é proveniente da via de formação dos prostanoídes. Assim, nós também avaliamos o envolvimento desta via no relaxamento

induzido pela progesterona no leito coronariano. Nossos dados demonstraram que a inibição desta via diminuiu a resposta vasodilatadora da progesterona nos machos, porém o mesmo não aconteceu nas fêmeas, mostrando que, possivelmente, a via de formação de prostanoídes tem uma participação na ação vasodilatadora da progesterona nos machos, mas não em fêmeas. De fato, em um estudo conduzido com camundongos duplo *knockout* para eNOS e COX-1, chamados camundongos EDHF, os machos ficaram hipertensos, enquanto as fêmeas permaneceram normotensas e apresentaram relaxamento de forma dependente do endotélio (SCOTLAND *et al.*, 2005), o que demonstra a importância da via de formação dos prostanoídes em machos. Já num estudo com anéis de aorta de fêmeas jovens, foi demonstrado que a progesterona pode atuar modulando positivamente a atividade da COX, dessa forma, aumentando a disponibilidade de prostanoídes vasodilatadores (CUTINI; CAMPELO; MASSHEIMER, 2014). Os efeitos da progesterona podem ser diferentes dependendo do tipo de vaso (SANTOS *et al.*, 2014), o que explica nosso resultado, tendo os prostanoídes importância na resposta vasodilatadora apenas de machos.

Além das vias de formação de NO e prostanoídes, investigamos se houve a participação de algum candidato a EDHF. Quando inibimos com L-NAME + indometacina, nas fêmeas, a resposta vasodilatadora foi potencializada, provavelmente em virtude da inibição individual com L-NAME, já que as fêmeas após inibição apenas com indometacina não houve diferença na resposta vasodilatadora. Esses achados sugerem a participação de algum EDHF nesta resposta. Nos machos, por outro lado, apesar de a resposta ter sido potencializada, essa resposta é diferente da observada na inibição individual com L-NAME. Nós sugerimos que, neste grupo, a redução do relaxamento a progesterona com a inibição da via de prostanoídes tenha influência na diminuição da resposta potencializada pela inibição da formação de NO, uma vez que, de acordo com nosso estudo, os prostanoídes medeiam a vasodilatação induzida pela progesterona. Assim, quando inibimos esta via a resposta vasodilatadora induzida pela progesterona fica diminuída.

Estudos do nosso grupo demonstraram que os EETs são fortes candidatos a EDHF no leito coronariano de ratos tanto normotensos (SANTOS *et al.*, 2004; ROUVER *et al.*, 2015), quanto hipertensos (SANTOS *et al.*, 2010). Assim, verificamos a

participação desse mediador endotelial na vasodilatação induzida pela progesterona com a inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP. Surpreendentemente, o relaxamento da progesterona foi similar em ambos os grupos, demonstrando que algum outro fator poderia estar atuando ou mesmo, na ausência de NO outros fatores estariam evidenciados, uma vez que o NO, indiretamente, prejudica a formação dos outros fatores de relaxamento derivados do endotélio (SILVA, B. R.; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Em ambos os sexos, na ausência de outros fatores vasodilatares, os EETs podem estar compensando o relaxamento induzido pela progesterona.

Os EETs interagem com os TRP membro 4 da subfamília vallinoide (TRPV4) que, uma vez ativado, disparam um gatilho para o grande influxo de cálcio através de cada canal TRPV4, levando à ativação dos canais IK_{Ca} e SK_{Ca} (WATANABE *et al.*, 2003; LOOT *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009). Essa corrente é então propensa a se espalhar através das junções comunicantes mioendoteliais, resultando em relaxamento (POPP *et al.*, 2002; GRIFFITH; CHAYTOR; EDWARDS, 2004). Os canais TRP se translocam rapidamente para cavéolas para modular o influxo de cálcio em resposta a 11,12-EETs nas células endoteliais (FLEMING, 2007). Em alguns leitos vasculares, um aumento no cálcio intracelular estimula a eNOS (KÖHLER *et al.*, 2006; HERCULE *et al.*, 2009).

Além disso, os EETs atuam nos canais BK_{Ca} expressos nas células musculares lisas. A ativação dos BK_{Ca} pelos EETs parece ser via GPCR do tipo G_s (estimulatório) (YANG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2011). EETs promovem a ligação do GTP a subunidade α dos GPCR em células endoteliais (NODE *et al.*, 2001) e os BK_{Ca} podem ser ativados diretamente por uma ação delimitada por G_s , ou por ativação de uma cascata de sinalização clássica. Os EETs ativam a AC e a PKA (WONG *et al.*, 1997; WONG; LAI; FALCK, 2000; NODE *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2007) que podem estimular a transmissão da hiperpolarização pelas junções comunicantes (BURGHARDT *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 2001; GRIFFITH *et al.*, 2002). Além disso, os EETs podem ativar os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) nas células musculares lisas de ratos (LI *et al.*, 1999; YE; ZHOU; LEE, 2005).

Outro fator capaz de agir como EDHF em artérias coronárias é o H_2O_2 (MATOBA *et al.*, 2000, 2002). Contudo, seu efeito pode variar de acordo com o leito vascular, a

espécie estudada e as condições experimentais (CHAYTOR *et al.*, 2003; GLUAIS *et al.*, 2005; LUCCHESI; BELMADANI; MATROUGUI, 2005). Tem sido relatado que o H_2O_2 causa vasodilatação e vasoconstrição (quando a hiperpolarização é comprometida) de artérias mesentéricas de camundongo perfundidas (LUCCHESI; BELMADANI; MATROUGUI, 2005) e pode ser diferente do EDHF em artérias femorais de coelho (CHAYTOR *et al.*, 2003). Foi também relatado que H_2O_2 induz vasodilatação dependente do endotélio por meio da liberação de PGE_2 pela COX-1 e relaxa diretamente o músculo liso vascular por hiperpolarização mediada pela ativação de K_{Ca} (THENGCHAI SRI; KUO, 2003).

Ao adicionarmos um catalizador da degradação de H_2O_2 (catalase) na solução de perfusão, a reposta induzida pela progesterona foi reduzida apenas nas fêmeas. Assim, sugere-se que a vasodilatação induzida pela progesterona no grupo fêmea, tenha participação do H_2O_2 . De fato, a análise de DCF mostrou um aumento nos níveis de H_2O_2 após estimulação com progesterona nas fêmeas. Embora os níveis de H_2O_2 em machos também tenham aumentado após estímulo com progesterona, acreditamos que neste grupo não há participação de H_2O_2 no relaxamento.

No endotélio, o H_2O_2 é proveniente da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ catalisada pela SOD (FARACI; DIDION, 2004). A dismutação é caracterizada por uma reação química, conhecida por oxirredução, em que a mesma espécie reativa é oxidada e reduzida (BIELSKI, B.H.; CABELLI, D.E, 1995). Neste caso, a SOD catalisa a reação do $O_2^{\bullet-}$ em $H_2O_2 + O_2$ por meio de reações alternadas de redução e oxidação dos metais presentes no sítio ativo da enzima (Cobre, Cu e Manganês, Mn) (HASSAN; FRIDOVICH, 1981; OSMAN; BASCH, 1984). Nos vasos sanguíneos, existem três isoformas de SOD que dismutam o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001). Cu, Zn-SOD está localizado principalmente no citosol, núcleo e, em menor grau, nas mitocôndrias (FARACI; DIDION, 2004), dismutando o $O_2^{\bullet-}$ e prolongando a meia-vida do NO (MUGGE *et al.*, 1991). A atividade Cu, Zn-SOD representa aproximadamente 50-80 % de todas as atividades de SOD na parede vascular (DIDION *et al.*, 2002). A Mn-SOD está localizada na mitocôndria catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ derivado das cadeias respiratórias (FARACI; DIDION, 2004). A SOD extracelular (ecSOD) está localizada extracelularmente e catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ extracelular para proteger a difusão do NO (FUKAI *et al.*, 2002).

Uma vez que a formação de H_2O_2 pode ocorrer pela dismutação de $O_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase, realizamos a curva de progesterona na presença de Tiron, *scavenger* para $O_2^{\bullet-}$. A resposta nas fêmeas foi reduzida enquanto nos machos não foi alterada. Desta forma, sugerimos que o $O_2^{\bullet-}$ teria sido catalizado a H_2O_2 , contribuindo para a resposta vasodilatadora nas fêmeas. Wassman *et al.* (2005), demonstraram que em aorta de ratos a progesterona promoveu a síntese de $O_2^{\bullet-}$ e esta síntese, em parte, ocorreu pela NOX (WASSMANN; WASSMANN; NICKENIG, 2005). No presente estudo, uma vez que o complexo enzimático foi inibido e a resposta a progesterona, nas fêmeas, foi reduzida, o que indica que a síntese de $O_2^{\bullet-}$ também teve participação da NOX. Desta forma, a SOD atuaria na formação de H_2O_2 , que atuaria como vasodilatador. Além disso, a formação de $O_2^{\bullet-}$ estimulada pela progesterona pode ter contribuído para formação de $ONOO^-$ em ambos em sexos.

Embora a resposta da progesterona, no leito coronariano de ratos normotensos tenha por característica uma ação rápida (vasodilatação em poucos segundos), o que sugere uma ação extranuclear, também avaliamos a participação dos receptores nucleares de progesterona, tendo em vista que a literatura demonstra um possível envolvimento desses receptores tanto em ações nucleares como extranucleares da progesterona (BOONYARATANAKORNKIT; EDWARDS, 2004). Uma vez realizada inibição desses receptores, apenas fêmeas tiveram a resposta vasodilatadora reduzida.

Sabe-se que, em artérias de humanos, como por exemplo nas artérias aórticas, o PR-B é igualmente expresso entre os sexos. Em contrapartida, no músculo liso vascular feminino o PR-A apresenta maior expressão quando comparado ao masculino (NAKAMURA *et al.*, 2005). Em outro estudo, foram identificados mRNA de PR-A e PR-B em células endoteliais de veia umbilical humana apesar de apenas os receptores PR-A tenham sido detectados nestas células (TATSUMI *et al.*, 2002). Assim, nossa sugestão é que a resposta vasodilatadora tenha envolvimento de PR apenas nas fêmeas. A literatura sugere que possivelmente a resposta da progesterona envolva a sinalização via PR-A, uma vez que PR-B está fortemente ligado a transcrição gênica e PR-A, em geral, pode desencadear suas funções de maneira dependente de ligações de outros receptores de hormônios esteróides, o que

inclui PR-B, receptor de estrogênio, receptor de andrógeno, receptor de glicocorticóide e receptor de mineralocorticóide cultura de células renais de macacos e cultura de células endometriais humanas (VEGETO *et al.*, 1993).

No final da década de 90 um novo receptor de estrogênio foi identificado, inicialmente nomeado, GPR30 (OWMAN *et al.*, 1996; CARMECI *et al.*, 1997; TAKADA *et al.*, 1997). Evidências demonstram que este receptor poderia desempenhar um papel importante na inibição do crescimento de células de câncer de mama humano (células MCF-7), induzida por progesterona, uma vez que a superexpressão deste receptor inibiu o crescimento destas células, enquanto a inibição da sua expressão reverteu o efeito inibidor do crescimento estimulado pela progesterona (AHOLA *et al.*, 2002). Thomas *et al.* (2005), demonstraram que o GPR30, atualmente nomeado GPER, apesar da alta afinidade pelo estrogênio, também pode desempenhar sua atividade quando estimulado pela progesterona em concentrações abaixo de 1 μ M (THOMAS *et al.*, 2005).

Tendo em vista uma possível participação do GPER na resposta vasodilatadora da progesterona no leito coronariano de ratos, decidimos avaliar a participação deste receptor. Nossos resultados demonstraram que, o efeito vasodilatador da progesterona, mesmo em concentrações de acima de 1 μ M, foi abolido em ambos os sexos. Estudos realizados por Debortoli *et al.* (2017) demonstraram que o GPER é expresso igualmente em coronárias de ratos normotensos de ambos os sexos. Desta forma, acreditamos que, no leito coronariano de ratos fêmeas e machos a progesterona, ao desencadear suas ações rápida também pode envolver a participação do GPER o que levaria a hiperpolarização e consequente relaxamento vascular.

Sabendo que os GPCR, em geral, podem diminuir a quantidade do estímulo se desligando da proteína G acoplada (FERGUSON; CARON, 1998) e para descartar a possibilidade de uma diminuição da ação da progesterona frente a inibição do GPER, por taquifilaxia, realizamos uma segunda curva de progesterona após 20 minutos do término da primeira curva sem a interferência de nenhum agente farmacológico. Para a farmacologia, taquifilaxia é entendida como uma diminuição progressiva em resposta a uma dada dose após administração repetida de uma substância

farmacologicamente ou fisiologicamente ativa (STEDMAN, 2006). Essa diminuição da resposta pode estar atrelada a internalização do receptor frente ao estímulo (FERGUSON, 2001). Em nosso estudo, encontramos que a resposta vasodilatadora da progesterona foi mantida, em ambos os sexos, mesmo após 20 minutos de intervalo, demonstrando dessa forma, que as modulações que ocorreram em resposta a progesterona (figura 22) foram decorrente dos efeitos dos agentes utilizados neste estudo e não de uma possível dessensibilização ao estímulo da progesterona.

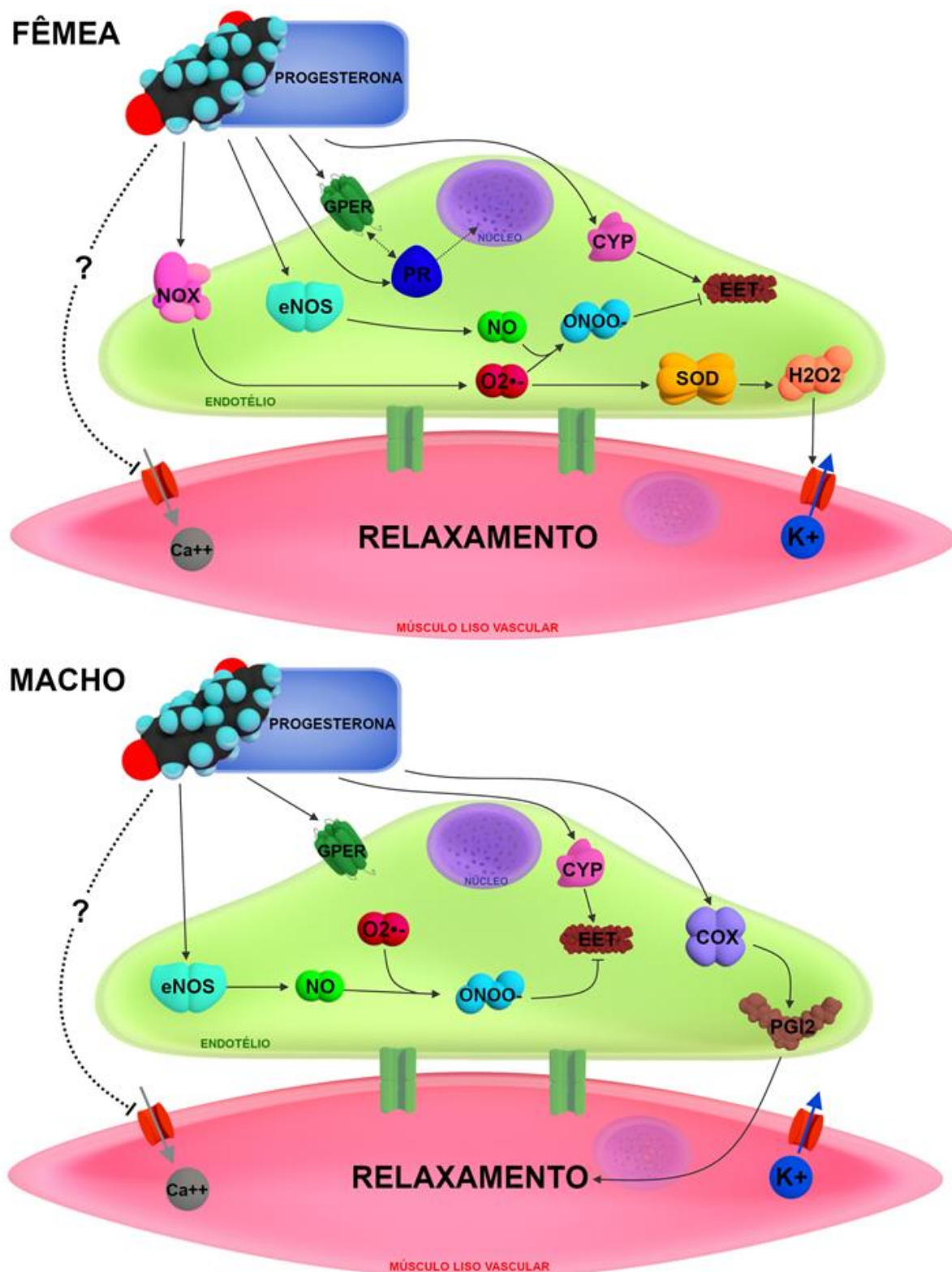


Figura 22: Possíveis fatores envolvidos no relaxamento induzido pela progesterona no leito coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos. → Estimulação unidirecional. ↔ Estimulação bidirecional. ⊣ Inibição ou bloqueio.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A progesterona parece ter um papel protetor na circulação coronariana de ratos normotensos de ambos os sexos, por ser capaz de promover relaxamento de maneira dose dependente. Esse efeito é, em parte, mediado por NO e H₂O₂ em fêmeas e NO e prostanoídes em machos. Além disso, a participação de outros fatores, em resposta a progesterona não pode ser desconsiderada. O GPER parece mediar a vasodilatação induzida pela progesterona em fêmeas e machos, enquanto o PR parece estar envolvido nessa resposta apenas nas fêmeas. Esses achados podem prover base para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação da progesterona no leito coronariano, podendo assim, contribuir para o desenvolvimento de novas formas de terapias que objetivam minimizar os riscos provenientes de alterações cardiovasculares decorrentes da diminuição da produção dos hormônios sexuais.



REFERÊNCIAS



7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R. et al. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. **Arteriosclerosis**, v. 10, p. 1051–1057, 1990.
- AHOLA, T. M. et al. G Protein-Coupled Receptor 30 Is Critical for a Progestin-Induced Growth Inhibition in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3376–3384, 2002.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ALLEN, W. M. PHYSIOLOGY OF THE CORPUS LUTEUM. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 92, n. 1, p. 174–188, 1930.
- ALLEN, W. M. Recollections of my Life with Progesterone. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 5, n. 3, p. 142–182, 1974.
- ALLEN, W. M. The preparation of purified progestin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 98, p. 581–605, 1932.
- ALVES, E. R. P. et al. Climacteric: intensity of symptoms and sexual performance. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 64–71, 2015.
- ANDERSEN, J. M.; DIETSCHY, J. M. Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 24, p. 9024–32, 1978.
- ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3203–7, 1977.
- BARLOW, R. S.; EL-MOWAFY, A. M.; WHITE, R. E. H₂O₂ opens BKCa channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 2, p. H475–H483, 2000.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. E67–E492, 2018.
- BERNARD, D. J.; WOODRUFF, T. K. Inhibin Binding Protein in Rats: Alternative

- Transcripts and Regulation in the Pituitary across the Estrous Cycle. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 4, p. 654–667, 2001.
- BIELSKI, B.H.; CABELLI, D.E. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. In: Foote, CS et al. (Orgs) **Active oxygen in chemistry**. London: Blackie, 1995. p. 66-104.
- BLUMING, A. Z.; TAVRIS, C. Hormone replacement therapy: Real concerns and false alarms. **Cancer Journal**, v. 15, n. 2, p. 93–104, 2009.
- BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.
- BOLTON, T. B. et al. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. **Novartis Foundation Symposium**, v. 246, p. 154-73, 2002.
- BONKHOFF, H. et al. Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. **The Prostate**, v. 48, n. 4, p. 285–291, 2001.
- BOSCHITSCH, E.; MAYERHOFER, S.; MAGOMETSCHNIGG, D. Hypertension in women: The role of progesterone and aldosterone. **Climacteric**, v. 13, n. 4, p. 307–313, 2010.
- BOUCHARD, J.-F.; DUMONT, E.; LAMONTAGNE, D. Evidence that prostaglandins I₂, E₂, and D₂ may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. **Cardiovascular Research**, v. 28, n. 6, p. 901–905, 1994.
- BRANDIN, L. M. et al. Effects of estrogen plus progesterone on hemodynamic and vascular reactivity in hypertensive postmenopausal women. **Journal Blood Pressure**, v. 19, n. 3, p. 156–163, 2010.
- BRASIL. Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa. 9. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science**, v. 191, n. 4223, p. 150–154, 1976.
- BURGER, H. G. et al. Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 4 Pt 1, p. 603–612, 2008.
- BURGHARDT, R. C. et al. Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. **The Journal of Membrane Biology**, v. 148, n. 3, p. 243–253, 1995.
- BURKE, T. M.; WOLIN, M. S. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. **American Journal of Physiology-Heart and**

- Circulatory Physiology**, v. 252, n. 4, p. H721–H732, 1987.
- CAIRRÃO, E. et al. Non-genomic vasorelaxant effects of 17 β -estradiol and progesterone on rat aorta are mediated by L- type Ca²⁺ current inhibition. **Acta Pharmacologica Sinica**, p. 615–624, 2012.
- CAMPBELL, W. B. et al. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, p. 881–895, 2010.
- CAMPBELL, W. B. et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, n. 3, p. 415–423, 1996.
- CAMPBELL, W. B.; HARDER, D. R. Prologue: EDHF–what is it? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2413–H2416, 2001.
- CARMECI, C. et al. Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. **Genomics**, v. 45, n. 3, p. 607–617, 1 nov. 1997.
- CHATAIGNEAU T. et al. Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. **Menopause**, v. 11, n. 3, p. 255–263, 2004.
- CHAUHAN, S.; HOBBS, A.; AHLUWALIA, A. C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarizing factor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1878–1881, 2004.
- CHAYTOR, A. T. et al. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15212–15217, 2003.
- CHEN, R.; YU, Y.; DONG, X. Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 166, p. 91–96, 2017.
- CHEN, Y. et al. 20-Iodo-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoyl-3-azidophenylsulfonamide: Photoaffinity Labeling of a 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Receptor. **Biochemistry**, v. 50, n. 18, p. 3840–3848, 2011.
- CHLOPICKI, S.; GRYGLEWSKI, R. J. Endothelial Secretory Function and

- Atherothrombosis. In: CURTIS-PRIOR, P. B. (Org.). **The eicosanoids**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2004. p. 267–276.
- CONDON, J. C. et al. Up-Regulation of the Progesterone Receptor (PR)-C Isoform in Laboring Myometrium by Activation of Nuclear Factor- κ B May Contribute to the Onset of Labor through Inhibition of PR Function. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 764–775, 2006.
- CORNER, G. W. The Early History of Progesterone. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 5, n. 2, p. 106–112, 1974.
- COSTA, E. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 98–107, 2018.
- CRANE, B. R. et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2121–2126, 1998.
- CUTINI, P. H.; CAMPELO, A. E.; MASSHEIMER, V. L. Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 3, p. 179–193, 2014.
- CUTINI, P.; SELLÉS, J.; MASSHEIMER, V. Cross-talk between rapid and long-term effects of progesterone on vascular tissue. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, p. 36–43, 2009.
- DALAL, P. K.; AGARWAL, M. Postmenopausal syndrome. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 57, p. S222-232, 2015.
- DEBORTOLI, A. R. et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 2017.
- DIDION, S. P. et al. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. **Circulation Research**, v. 91, n. 10, p. 938–44, 15 nov. 2002.
- DOS SANTOS, R. L. et al. Tributyltin Impairs the Coronary Vasodilation Induced by 17β -Estradiol in Isolated Rat Heart. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 948–959, 15 ago. 2012..
- DUBEY, R. K. et al. Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease What Went Wrong and Where Do We Go From Here? **Hypertension**, v. 44, n. 6, p. 789–795, 2004.
- DUDZINSKI, D. M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, n. 1, p.

235–276, 2006.

EDWARDS, G. et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.

Nature, v. 396, n. 6708, p. 269–272, 1998.

ELIAS, M. de oliveira et al. Nitric oxide modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity through cyclic GMP pathway in proximal rat trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 367, n. 2–3, p. 307–314, 1999.

FANG, X. et al. Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 6, p. H2412–H2420, 2004.

FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 8, p. 1367–1373, 2004.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. **Annals of Medicine**, v. 44, n. 7, p. 694–716, 2012.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1215–1225, 2006.

FERGUSON, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 1–24, 2001.

FERGUSON, S. S. G.; CARON, M. G. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 2, p. 119–127, 1998.

FERNANDES, D C et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C413–C422, 2007.

FISSLTHALER, B. et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 493–497, 1999.

FLEMING, I. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 166–70, 2000.

FLEMING, I. et al. Epoxyeicosatrienoic Acids Regulate Trp Channel–Dependent Ca²⁺ Signaling and Hyperpolarization in Endothelial Cells. **Arteriosclerosis**,

- Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, p. 2612–2618, 2007.
- FORSTERMANN, U. et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circulation Research**, v. 58, n. 4, p. 531–538, 1986.
- FORSTERMANN, U.; LI, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2, p. 213–223, 2011.
- FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.
- FORTIER, A.; GULLAPALLI, V.; MIRSHAMS, R. A. Review of biomechanical studies of arteries and their effect on stent performance. **International Journal of Cardiology: Heart & Vessels**, v. 4, p. 12–18, 2014.
- FUKAI, T. et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 2, p. 239–249, 2002.
- FULTON, D. et al. A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 8, p. 1713–1721, 1998.
- GAMBRELL, R. D. Use of progestogen therapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 156, n. 5, p. 1304–1313, 1987.
- GELLERSEN, B.; FERNANDES, M. S.; BROSENS, J. J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 1, p. 119–138, 22 out. 2008.
- GIBBS, Z.; LEE, S.; KULKARNI, J. Factors Associated with Depression During the Perimenopausal **Transition. Women's Health Issues**, v. 23, n. 5, p. e301–e307, 2013.
- GLUAIS, P. et al. Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 513, n. 3, p. 219–224, 2005.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.
- GOLETIANI, N. V.; KEITH, D. R.; GORSKY, S. J. Progesterone: Review of safety for clinical studies. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 15, n. 5,

- p. 427–444, 2007.
- GRADY, D. et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 1, p. 49–57, 2002.
- GRADY, D. et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, n. 12, p. 1016–1037, 1992.
- GRIFFITH, T. M. et al. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6392–6399, 2002.
- GRIFFITH, T. M.; CHAYTOR, A. T.; EDWARDS, D. H. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 6, p. 551–564, 2004.
- GRIMES, D. A.; LOBO, R. A. Perspectives on the Women's Health Initiative Trial of Hormone Replacement Therapy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 101, n. 4, p. 811–814, 2002.
- GUPTA, S. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 2, p. H577–H582, 1994.
- HADI, H. A. R.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular Health and Risk Management**, v. 1, n. 3, p. 183–198, 2005.
- HAGAN, C. R.; FAIVRE, E. J. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. **Steroids**, v. 74, n. 7, p. 568–572, 2009.
- HAN, G. et al. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H314–H321, 2007.
- HANAFY, K. A.; KRUMENACKER, J. S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 7, n. 4, p. 801–19, 2001.
- HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. **European Journal of Rheumatology and Inflammation**, v. 4, n. 2,

p. 160–72, 1981.

HATTORI, T. et al. Effects of H₂O₂ on membrane potential of smooth muscle cells in rabbit mesenteric resistance artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 464, n. 2–3, p. 101–109, 2003.

HECKER, M. et al. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. **The Journal of Physiology**, v. 481, n. 2, p. 407–14, 1994.

HENDERSON, B. E.; PAGANINI-HILL, A.; ROSS, R. K. Decreased Mortality in Users of Estrogen Replacement Therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 151, n. 1, p. 75–78, 1991.

HERCULE, H. C. et al. Interaction Between P450 Eicosanoids and Nitric Oxide in the Control of Arterial Tone in Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 1, p. 54–60, 2009.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Analytical chemistry of nitric oxide. **Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 2, p. 409–433, 2009.

HULLEY, S. et al. Cardiovascular Disease Outcomes During 6.8 Years of Hormone Therapy: heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERSII). **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 1, p. 49–57, 2002.

HULLEY, S. et al. Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. **Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 7, p. 605–613, 1998.

IGNARRO, L. J. et al. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 237, n. 3, p. 893–900, 1986.

IIDA, Y.; KATUSIC, Z. S. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. **Stroke**, v. 31, n. 9, p. 2224–2230, 2000.

INGEGNO, M. D. et al. Progesterone receptors in the human heart and great vessels. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 59, n. 3, p. 353–356, 1988.

JURY, J.; BOEV, K. R.; DANIEL, E. E. Nitric oxide mediates outward potassium currents in opossum esophageal circular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 270, n. 6, p. G932–G938, 1996.

- KERR, S. et al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 33, n. 6, p. 1353–1358, jun. 1999.
- KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 100, n. 5, p. 567–75, 1993.
- KNOCK, G. A. et al. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 633–642, 2009.
- KÖHLER, R. et al. Evidence for a Functional Role of Endothelial Transient Receptor Potential V4 in Shear Stress–Induced Vasodilatation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 7, p. 1495–1502, 2006.
- KOJIMA, H. et al. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 21, p. 3209–3212, 1999.
- KUMAR V; ABBAS A; FAUSTO N. Blood Vessels. 9. ed. In: **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 2014.
- LAURSEN, J. B. et al. Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1282–1288, 2001.
- LI, P. L. et al. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. **Circulation Research**, v. 85, n. 4, p. 349–356, 1999.
- LIU, Y. et al. Peroxynitrite inhibits Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. **Circulation Research**, v. 91, n. 11, p. 1070–1076, 2002.
- LOBO, R. A. Hormone-replacement therapy: current thinking. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 220–231, 2017.
- LONARD, D. M.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear Receptor Coregulators and Human Disease. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 575–587, 2007.
- LOOT, A. E. et al. Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation. **Cardiovascular Research**, v. 80, n. 3, p. 445–452, 2008.
- LUCCHESI, P. A.; BELMADANI, S. and; MATROUGUI, K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric

- resistance arteries. **Journal of Hypertension**, v. 23, p. 571–579, 2005.
- MACLENNAN, A. H. Evidence-based review of therapies at the menopause. **International Journal of Evidence-Based Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 112-123, 2009.
- MÄKI-PETÄJÄ, K. et al. The role of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 28–44, 2015.
- MANSON, J. E. et al. Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 523–534, 2003.
- MANSUR, A. de P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 2, p. 755–761, 2012.
- MARCONDES, F K; BIANCHI, F J; TANNO, A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARTINEZ-LEMUS, L. A. The Dynamic Structure of Arterioles. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 5–11, 2012.
- MATOBA, T. et al. Electron Spin Resonance Detection of Hydrogen Peroxide as an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Porcine Coronary Microvessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1224–1230, 1 jul. 2003.
- MATOBA, T. et al. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 3, p. 909–913, 2002.
- MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521–1530, 2000.
- MCCULLOCH, A. I.; RANDALL, M. D. Sex differences in the relative contributions of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium-dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1700–1706, 1998.
- MCKEE, M.; SCAVONE, C.; NATHANSON, J. A. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12056–12060, 1994.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and Cellular Basis of Cardiovascular Gender Differences. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1583–1587, 2005.

- MINSHALL, R. D. et al. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, p. 701–708, 2002.
- MITCHELL, J. A. et al. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 1, p. 141–147, 2008.
- MOLINARI, C. et al. The Effect of Progesterone on Coronary Blood Flow in Anaesthetized Pigs. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 1, p. 101–108, 2001.
- MOORE, P. K. Prostaglandins, prostacyclin and thromboxanes. **Biochemical Education**, v. 10, n. 3, p. 82–87, 1982.
- MORIKAWA, K. et al. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium dependent hyperpolarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1871–1879, 2003.
- MOSCA, L. et al. Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women: 2007 Update. **Circulation**, v. 115, n. 11, p. 1481–1501, 2007.
- MOYSÉS, M. R.; BARKER, L. A.; CABRAL, A. M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 7, p. 949–958, 2001.
- MUECK, A. O.; SEEGER, H. Progestogens and target tissues: Vascular systems. **Maturitas**, v. 62, p. 356–361, 2009.
- MUGGE, A. et al. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 260, n. 2, p. C219–C225, 1991.
- MURPHY, J. G.; KHALIL, R. A. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 44–52, 1999.
- MURRAY, J. A. et al. Nitric oxide modulates a calcium-activated potassium current in muscle cells from opossum esophagus. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 269, n. 4, p. G606–G612, 1995.
- NAKAMURA, Y. et al. Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. **Endocrine Journal**, v. 52, n. 2, p. 245–252, 2005.
- NATH, A.; SITRUK-WARE, R. Different cardiovascular effects of progestins according to structure and activity. *Climacteric: the journal of the International Menopause Society*, v. 12, n.1, p. 96-101, 2009.

- NELSON, M. T. et al. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. **Nature**, v. 344, n. 6268, p. 770–773, 1990.
- NEWTON, S. J. The history of progesterone. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 11, n. 4, p. 274–7, 2007.
- NODE, K. et al. Activation of Gαs Mediates Induction of Tissue-type Plasminogen Activator Gene Transcription by Epoxyeicosatrienoic Acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15983–15989, 2001.
- NORTH, B. J.; SINCLAIR, D. A. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 110, n. 8, p. 1097–1108, 2012.
- ODENLUND, M.; EKBLAD, E.; NILSSON, B.O. Stimulation of oestrogen receptor-expressing endothelial cells with oestrogen reduces proliferation of cocultured vascular smooth muscle cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 3, p. 245–248, 2008.
- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, 2001.
- ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R233–R249, 2004.
- OSMAN, R.; BASCH, H. On the mechanism of action of superoxide dismutase: a theoretical study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 19, p. 5710–5714, set. 1984.
- OWMAN, C. et al. Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 2, p. 285–292, 1996.
- PANG, Y.; DONG, J.; THOMAS, P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor-α. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 10, p. E899–E911, 2015.
- PARKER, M. G.; CHRISTIAN, M.; WHITE, R. The nuclear receptor co-repressor RIP140 controls the expression of metabolic gene networks: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1103–1106, 2006.
- POPP, R. et al. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication

- by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **Circulation Research**, v. 90, n. 7, p. 800–806, 2002.
- RAMÍREZ-ROSAS, M. B. et al. Pharmacological characterization of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by progesterone and 17 β -estradiol on isolated canine basilar and internal carotid. **Steroids**, v. 89, p. 33–40, 2014.
- RANDALL, M. D. et al. An Endogenous Cannabinoid as an Endothelium-Derived Vasorelaxant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 229, n. 1, p. 114–120, 1996.
- RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 306, n. 5939, p. 174–176, 1983.
- ROSANO, G. M. C.; SPOLETINI, I.; VITALE, C. Cardiovascular disease in women, is it different to men? The role of sex hormones. **Climacteric**, v. 20, n. 2, p. 125–128, 2017.
- ROSOLOWSKY, M.; CAMPBELL, W. B. Role of PGI₂ and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 264, n. 2, p. H327–H335, 1993.
- ROSOLOWSKY, M.; CAMPBELL, W. B. Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1299, n. 2, p. 267–277, 1996.
- ROSS, R. L.; SEROCK, M. R.; KHALIL, R. A. Experimental Benefits of Sex Hormones on Vascular Function and the Outcome of Hormone Therapy in Cardiovascular Disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 309–322, 2008.
- ROSSETTI, M. F. et al. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 7, p. 1-11, 2016.
- ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p. 321–33, 17, 2002.
- ROUVER, W. N. et al. Testosterone replacement therapy prevents alterations of coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency induced by castration. **PLOS ONE**, v 10, n. 8, p. e0137111, 2015.

- RUPNOW, H. L. et al. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and progesterone effects on eNOS. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 4, p. H1699–H1705, 2001.
- SANDOO, A. et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 302–312, 2010.
- SANTOS, R. L. et al. Deficiency of sex hormones does not affect 17- β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. e5058, 2016.
- SANTOS, R. L. et al. Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 569–575, abr. 2004.
- SANTOS, R. L. et al. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiologica**, v. 200, n. 3, p. 203–210, 2010.
- SANTOS, R. L. et al. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 89–103, 2014.
- SATO, T.; MIYAGAWA, S.; IGUCHI, T. Progesterone. In: TAKEI, Y. ANDO, H. TSUTSUI, K. (Orgs.). **Handbook of Hormones**, 1. ed. 2016.
- SATOH, M. et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 288, n. 6, p. F1144–F1152, 2005.
- SCARPIN, K. M. et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 7, p. e009, 2009.
- SCHNEIDER, M. A.; DAVIES, M. C.; HONOUR, J. W. The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 5, p. 1059–1064, 1993.
- SCOTLAND, R. S. et al. Investigation of Vascular Responses in Endothelial Nitric Oxide Synthase/Cyclooxygenase-1 Double-Knockout Mice Key Role for Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in the Regulation of Blood Pressure in Vivo. **Circulation**, v. 111, n. 6, p. 796-803, 2005.
- SELLES, J. et al. Nongenomic action of progesterone in rat aorta: **Role of Nitric Oxide**

and Prostaglandins. v. 14, p. 431–436, 2002.

- SELLES, J. et al. Progesterone and 17-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. **Life Sciences**, v. 69, n. 7, p. 815–827, 2001.
- SHACKLETON, C.; MALUNOWICZ, E. Apparent pregnene hydroxylation deficiency (APHD): seeking the parentage of an orphan metabolome. **Steroids**, v. 68, n. 9, p. 707–717, 1 out. 2003.
- SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1–5, 2012.
- SILVA, J F et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Vascular Pharmacology**, v. 82, p. 73-81, 2016.
- SILVA, J. F. et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Vascular Pharmacology**, v. 82, p. 73–81, 2016.
- SIMONCINI, T. et al. Differential Signal Transduction of Progesterone and Medroxyprogesterone Acetate in Human Endothelial Cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5745–5756, 2004.
- SIMONCINI, T. et al. Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. **Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 2325–2334, 2007.
- SMITH, J. L. et al. Heterologous expression of human mPR α , mPR β and mPR γ in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. **Steroids**, v. 73, n. 11, p. 1160–1173, 2008.
- SOBEY, C. G.; HEISTAD, D. D.; FARACI, F. M, Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. **Stroke**, v. 28, n. 11, p. 2290–2295, 1997.
- SOMBERG, L B et al. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 30-37, 2016.
- SOMBERG, L. B. et al. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 30–37, 2017.
- SONKUSARE, S. K. et. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* al.

- Elementary Ca^{2+} Signals Through Endothelial TRPV4 Channels Regulate Vascular Function. **Science**, v. 336, n. 6081, p. 597–601, 2012.
- SOULES, M. R. et al. Executive summary: stages of reproductive aging workshop (STRAW). **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 5, p. 874–878, 2001.
- SPECTOR, A. A. et al. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 1, p. 55–90, 2004.
- SPINELLI, M. G. Depression and hormone therapy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 2, p. 428–36, 2004.
- STAMPFER, M. J. et al. Postmenopausal Estrogen Therapy and Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 11, p. 756–762, 1991.
- STEDMAN, T. L. **Stedman's medical dictionary**. 28. ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- STEFANICK, M. L. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 12, p. 64–73, 2005.
- STRAUSS, J. F. The Synthesis and Metabolism of Steroid Hormones. In: JEROME F. STRAUSS, I. R. L. B. (Orgs.). **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology**. W.B. Saunders, 2009.
- STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14533–6, 2001.
- SUN, D.; HUANG, A.; KALEY, G. Mechanical compression elicits NO-dependent increases in coronary flow. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 6, p. H2454–H2460, 2004.
- TAKADA, Y. et al. Cloning of cDNAs Encoding G Protein-Coupled Receptor Expressed in Human Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, n. 3, p. 737–741, 1997.
- TANAKA, Y. et al. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI₂ analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. **Current Medicinal Chemistry. Cardiovascular and Hematological Agents**, v. 2, n. 3, p. 257–265, 2004.
- TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, n. 2, p. 140–149, 2009.
- TANG, Y. T. et al. PAQR Proteins: A Novel Membrane Receptor Family Defined by an

- Ancient7-Transmembrane Pass Motif. **Journal of Molecular Evolution**, v. 61, n. 3, p. 372–380, 2005.
- TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 94, n. 161, p. 8–16, 2015.
- TARAFDAR, A. et al. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3824, 2018.
- TATSUMI, H. et al. Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins. **Maturitas**, v. 42, n. 4, p. 287–294, 2002.
- TAYLOR, H. J. et al. Gap junction-dependent increases in smooth muscle cAMP underpin the EDHF phenomenon in rabbit arteries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, n. 3, p. 583–589, 2001.
- TENNANT, M.; MCGEACHIE, J. K. Blood Vessel Structure and Function: A Brief Update on Recent Advances. **ANZ Journal of Surgery**, v. 60, n. 10, p. 747–753, 1990.
- THENGCHAISRI, N.; KUO, L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 6, p. H2255–H2263, 2003.
- THOMAS, P. et al. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, 2005.
- THOMAS, P. et al. Steroid and G Protein Binding Characteristics of the Seatrout and Human Progestin Membrane Receptor α Subtypes and Their Evolutionary Origins. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 705–718, 2007.
- THOMPSON, J.; KHALIL, R. A. Gender differences in the regulation of vascular tone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 1–2, p. 1–15, 2003.
- VALLE-RODRIGUEZ, A. d.; LÓPEZ-BARNEO, J.; UREÑA, J. Ca^{2+} channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca^{2+} influx. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 17, p. 4337–4345, 2003.
- VALVERDE, L. F. et al. Changes induced by estradiol-ethylenediamine derivative on perfusion pressure and coronary resistance in isolated rat heart: L-type calcium

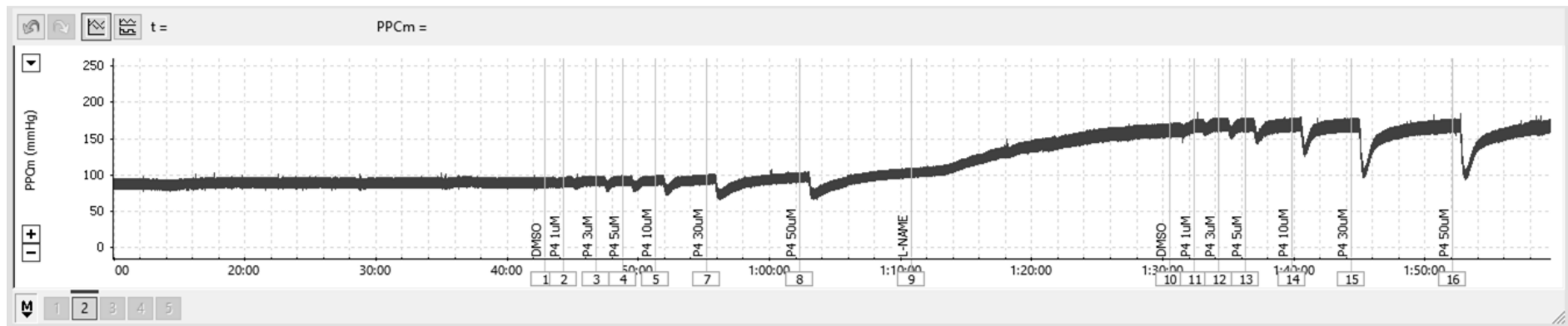
- channel. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 155, n. 1, p. 27–32, 2011.
- VÁZQUEZ, F. et al. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2185–92, 1999.
- VEGETO, E. et al. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 10, p. 1244–1255, 1993.
- VRIENS, J. et al. Modulation of the Ca²⁺ Permeable Cation Channel TRPV4 by Cytochrome P450 Epoxygenases in Vascular Endothelium. **Circulation Research**, v. 97, n. 9, p. 908–915, 2005.
- WASSMANN, K.; WASSMANN, S.; NICKENIG, G. Progesterone Antagonizes the Vasoprotective Effect of Estrogen on Antioxidant Enzyme Expression and Function. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 1046-1054, 2005.
- WATANABE, H. et al. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 434–438, 2003.
- WEI, E. P.; KONTOS, H. A.; BECKMAN, J. S. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, n. 3, p. H1262–H1266, 1996.
- WEISS, N. S. Risks and Benefits of Estrogen Use. **New England Journal of Medicine**, v. 293, n. 23, p. 1200–1202, 1975.
- WHARTON, W. et al. Rationale and design of the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS) and the KEEPS cognitive and affective sub study (KEEPS Cog). **Brain Research**, v. 1514, p. 12–17, 13 jun. 2013.
- WHO, World Health Organization. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 16 mar. 2019.
- WHO, World Health Organization. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva. 2011.
- WIDLANSKY, M. E. et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 7, p. 1149–1160, 2003.
- WONG, P. Y. et al. Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 16, n. 3, p. 155–69, 1997.

- WONG, P. Y.-K.; LAI, P.-S.; FALCK, J. Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 62, n. 4, p. 321–333, 2000.
- WOODRUFF, J. D.; PICKAR, J. H. Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, n. 5 Pt 1, p. 1213–23, 1994.
- XIU, F. et al. High Physiological Concentrations of Progesterone Reverse Estradiol-Mediated Changes in Differentiation and Functions of Bone Marrow Derived Dendritic Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153304, 2016.
- YANG, W. et al. Characterization of Epoxyeicosatrienoic Acid Binding Site in U937 Membranes Using a Novel Radiolabeled Agonist, 20-125I-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoic Acid. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 3, p. 1019–1027, 2007.
- YE, D.; ZHOU, W.; LEE, H.-C. Activation of rat mesenteric arterial KATP channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 1, p. H358–H364, 2005.
- YU, Y. et al. Prostate Stromal Cells Express the Progesterone Receptor to Control Cancer Cell Mobility. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92714, 2014.
- ZHANG, D. X. et al. Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4–Deficient Mice Exhibit Impaired Endothelium-Dependent Relaxation Induced by Acetylcholine In Vitro and In Vivo. **Hypertension**, v. 53, n. 3, p. 532–538, 2009.
- ZHANG, M. et al. Rapid effect of progesterone on the contraction of rat aorta in-vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 11, p. 1529–1534, 2002.
- ZHAO, W. et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. **The EMBO journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 2001.
- ZOU, M. H.; ULLRICH, V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. **FEBS Letter**, v. 382, n. 1-2, p. 101-104, 1996.
- ZOU, M.-H.; SHI, C.; COHEN, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, p. 817–26, 2002.

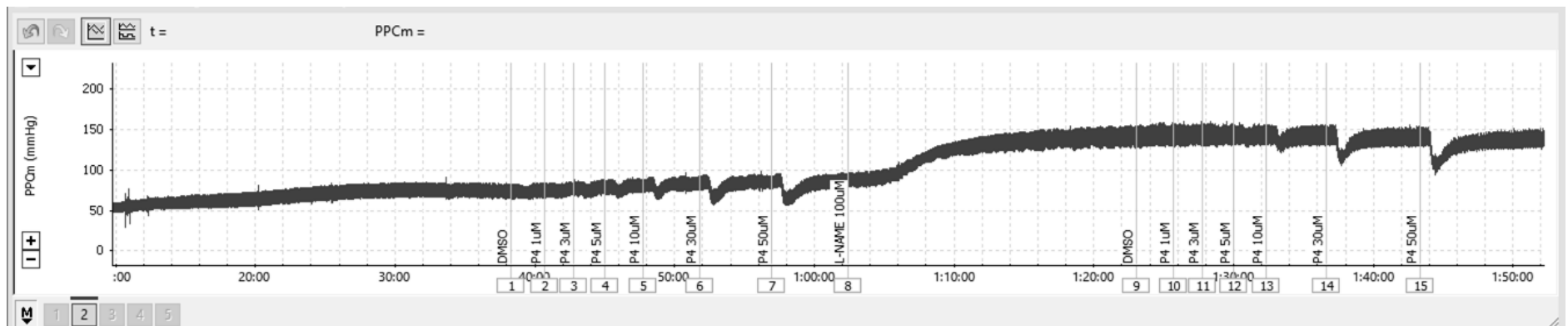
APÊNDICES

APÊNDICE A – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com L-NAME.

Fêmeas

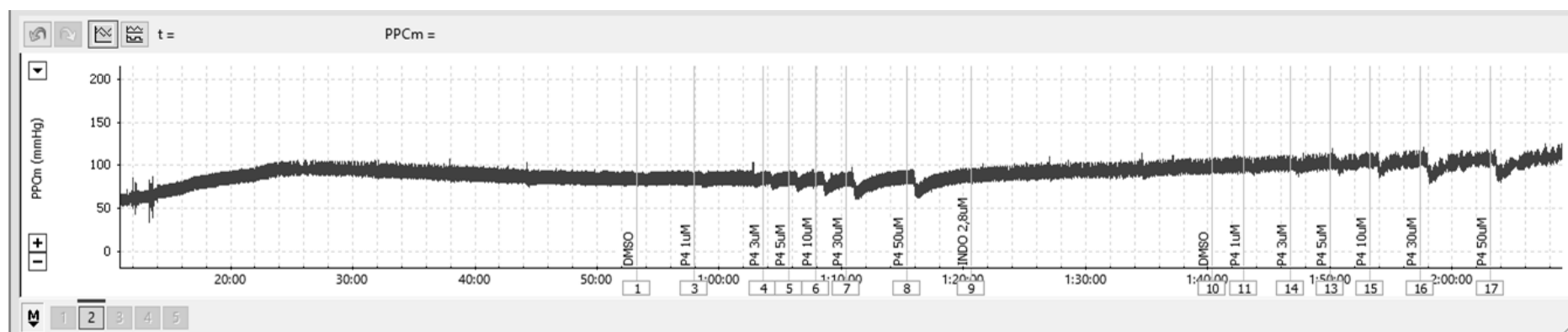


Machos

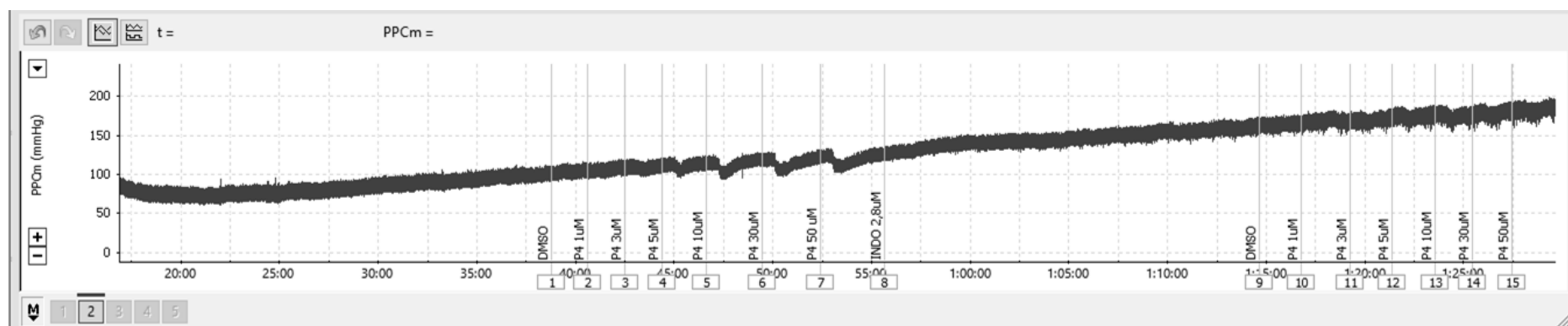


APÊNDICE B – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com indometacina.

Fêmeas

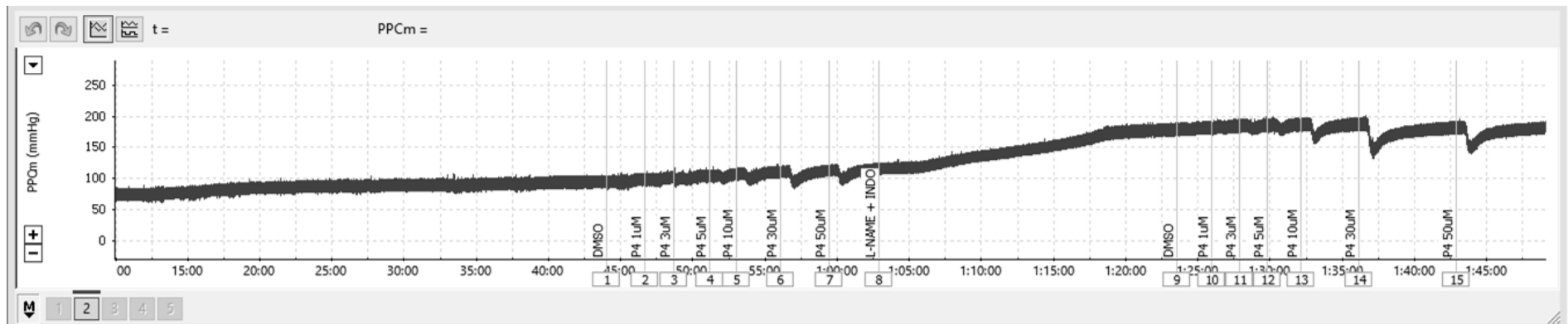


Machos

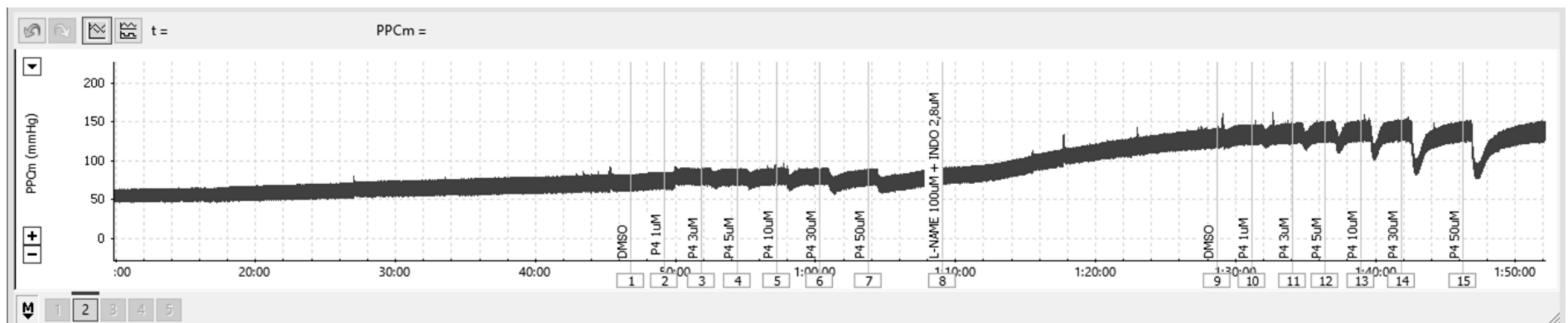


APÊNDICE C – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME e indometacina.

Fêmeas

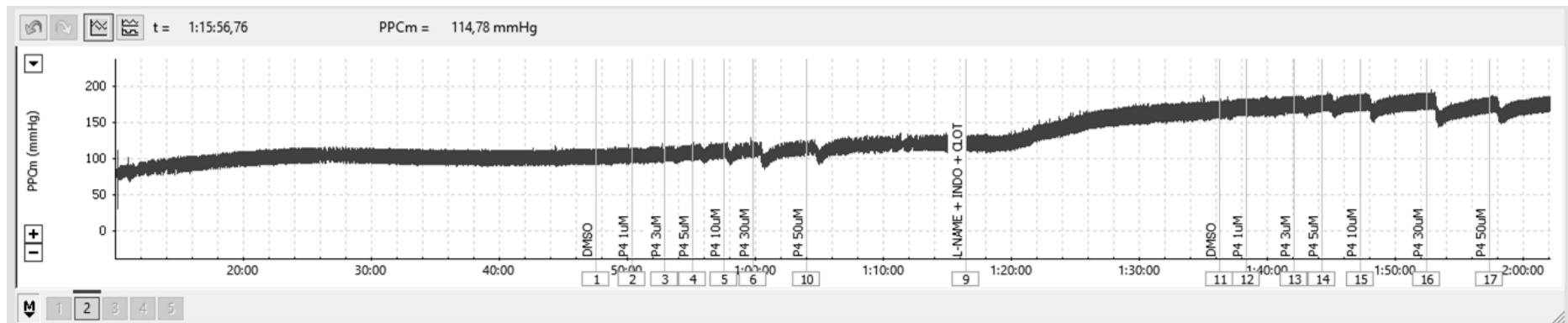


Machos

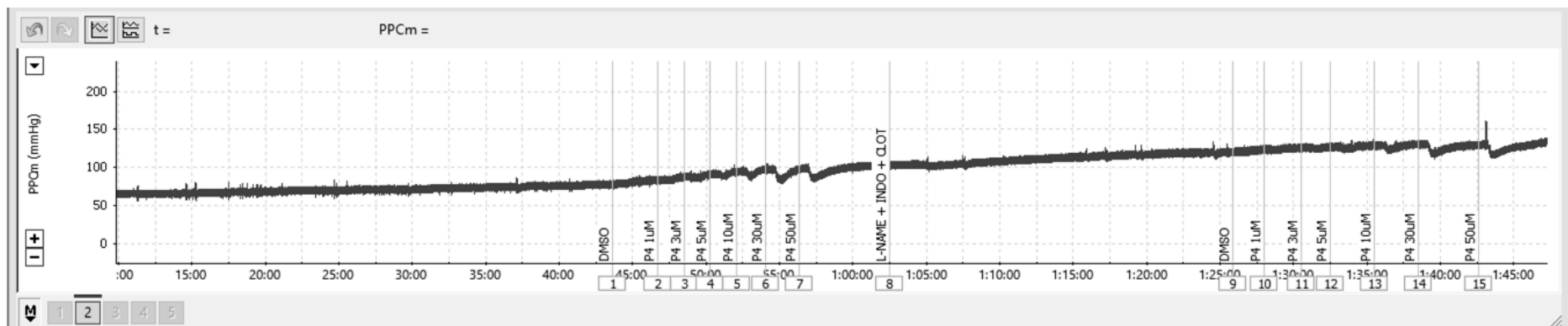


APÊNDICE D – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME, indometacina e clotrimazol.

Fêmeas

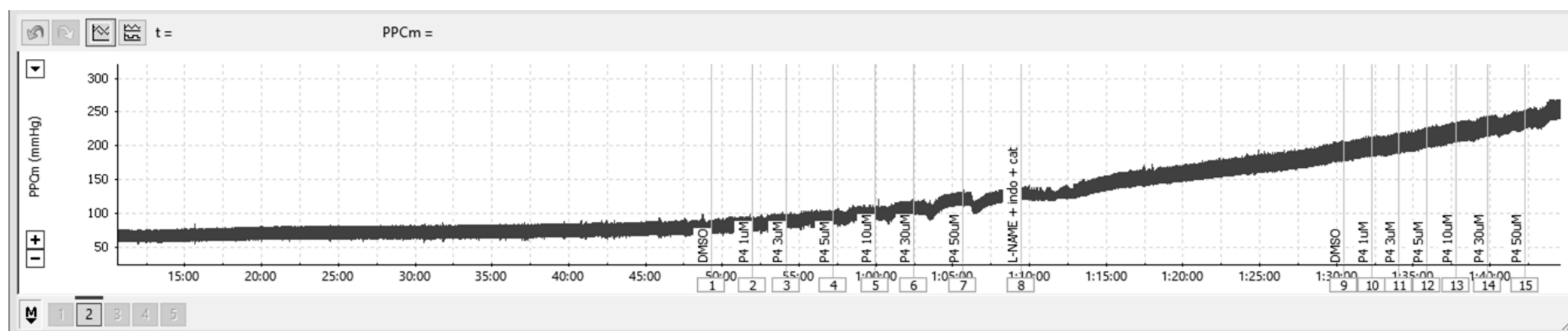


Machos

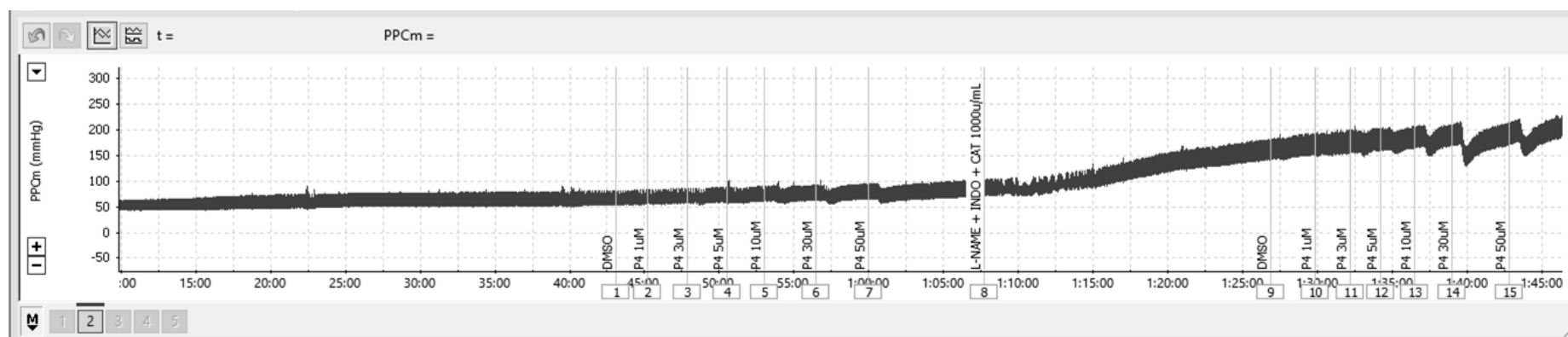


APÊNDICE E – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição combinada de L-NAME, indometacina e catalase.

Fêmeas

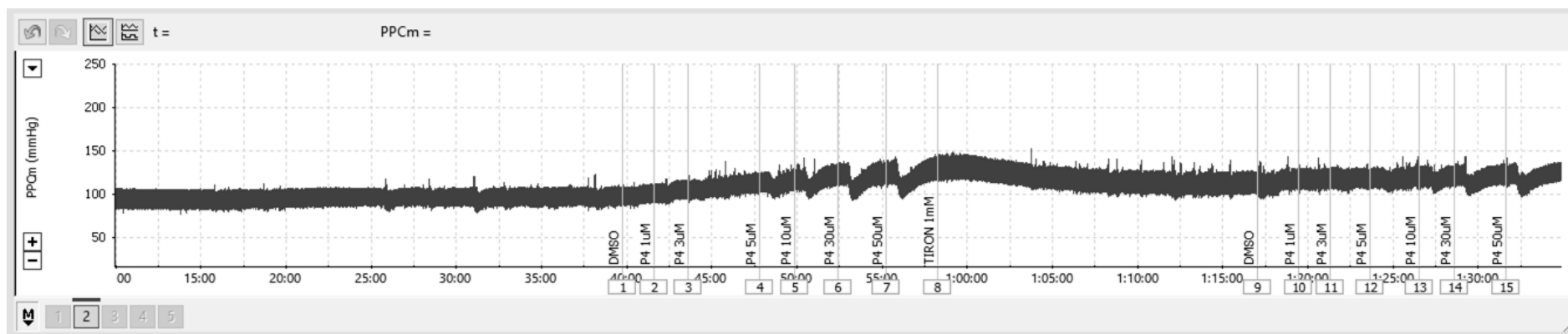


Machos

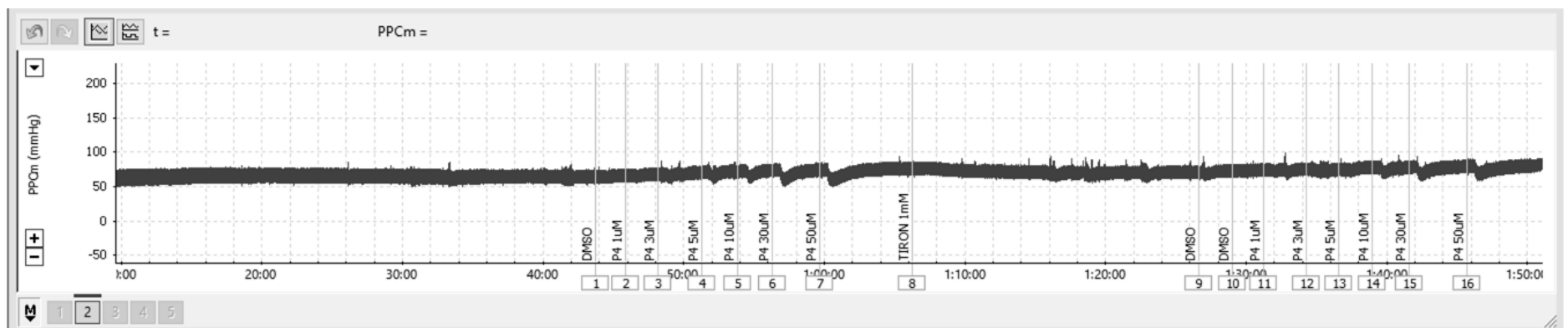


APÊNDICE F – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com Tiron.

Fêmeas

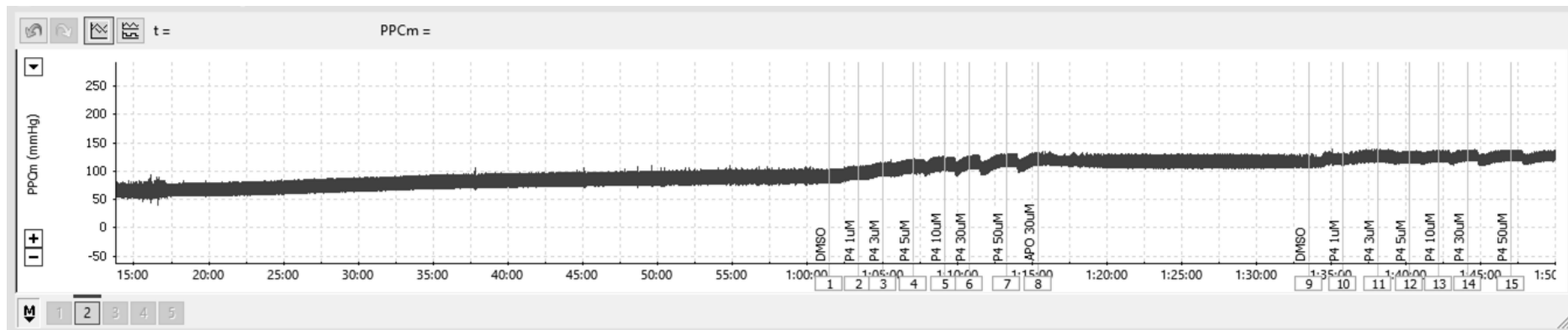


Machos

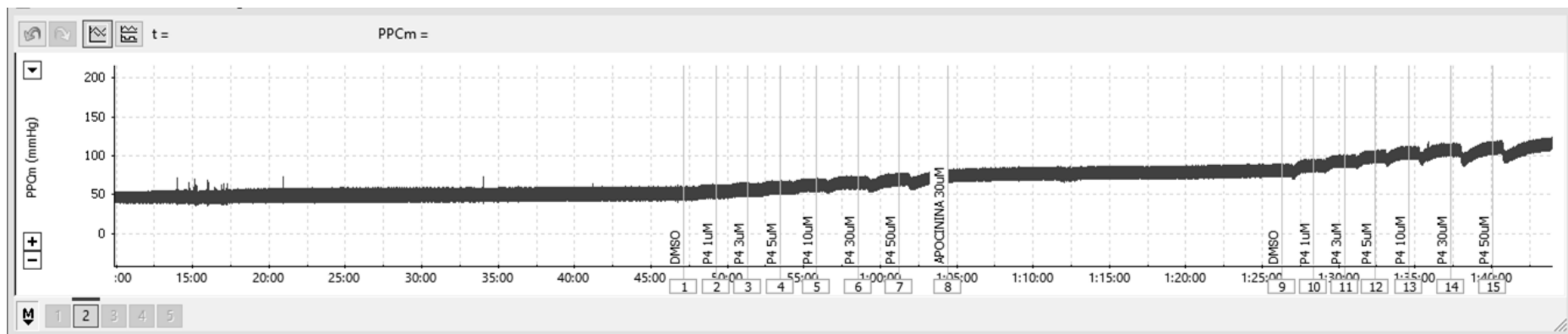


APÊNDICE G – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com Apocinina.

Fêmeas

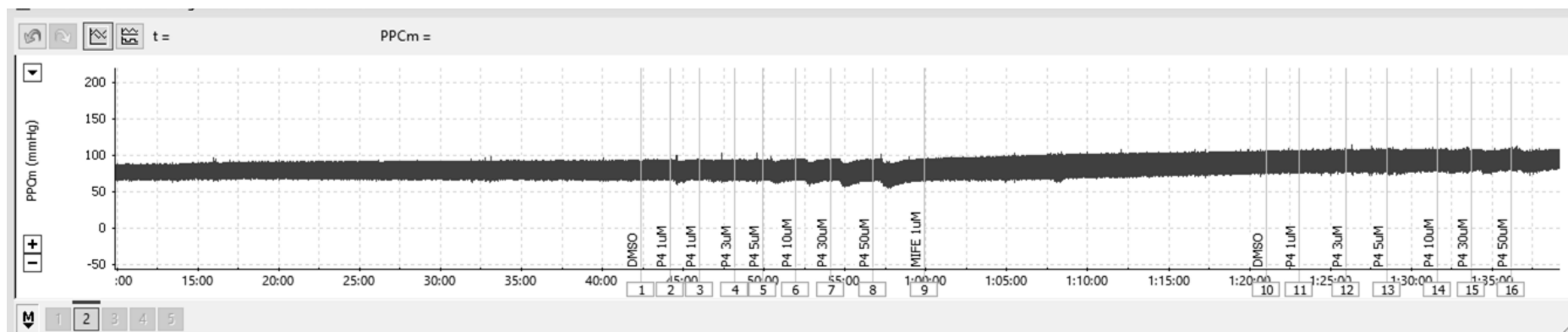


Machos

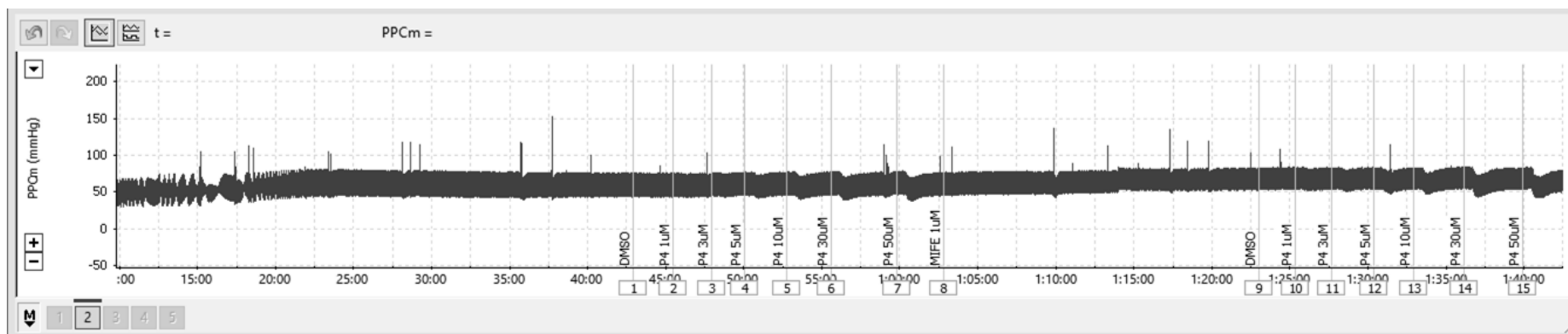


APÊNDICE H – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida pela inibição com mifepristona.

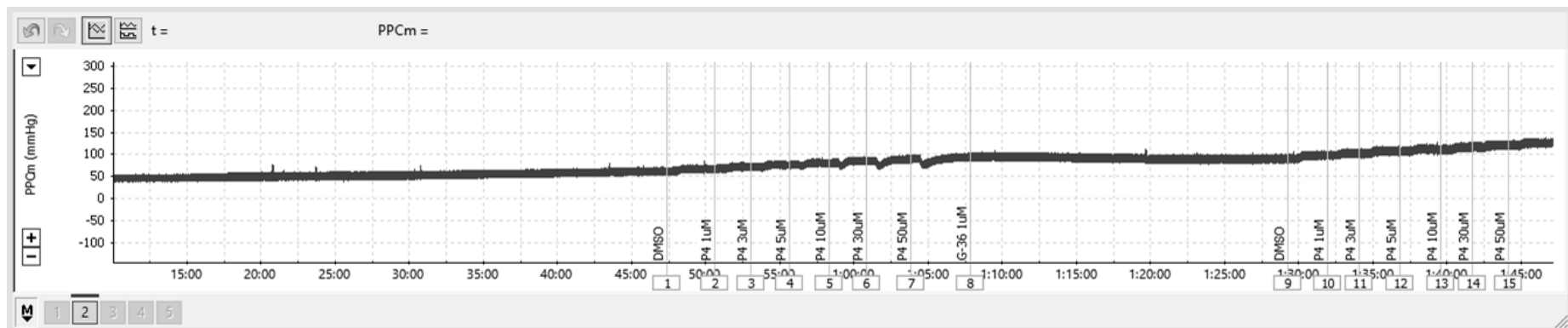
Fêmeas



Machos

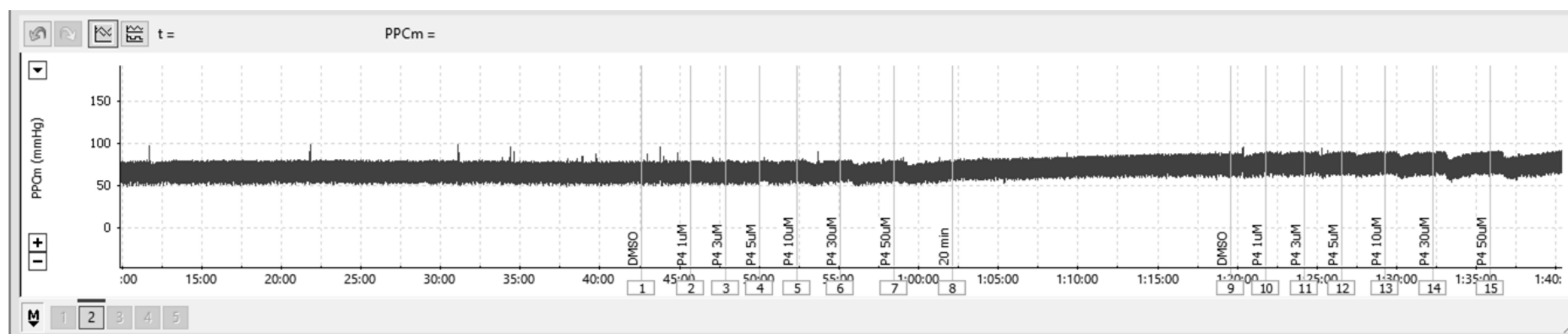


Fêmeas



APÊNDICE J – Registro típico da curva de relaxamento induzida pela progesterona no leito coronariano de ratos seguida de uma nova curva sem influência de inibidores.

Fêmeas



Machos

